

ASTRID SPANG

Rekrudescenz der Spermatogenese beim Hund
nach gezielter Aufhebung der Downregulation der
germinativen und endokrinen Hodenfunktion:
Untersuchungen unter besonderer Berücksichtigung
des Androgenrezeptors



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2016

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2016

© 2016 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus der
Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere
mit Tierärztlicher Ambulanz
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. h.c. Bernd Hoffmann

**Rekrudescenz der Spermatogenese beim Hund nach gezielter Aufhebung der
Downregulation der germinativen und endokrinen Hodenfunktion:**

Untersuchungen unter besonderer Berücksichtigung des Androgenrezeptors

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Astrid Spang
Tierärztin aus Neuwied

Gießen 2015

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. Bernd Hoffmann
Prof. Dr. Martin Bergmann

Tag der Disputation: 21. August 2015

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Astrid Spang



Meinen Eltern

Ulla und Peter Spang

in Liebe und Dankbarkeit

gewidmet.



Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse wurden zum Teil in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Spang A., Goericke-Pesch S., Bergmann M. und Hoffmann B. (2008)

Recrudescence of spermtogenesis following downregulation with a GnRH-implant
in the dog - first morphological and hormone-analytical results.

Reprod. Domest. Anim. 43 (Suppl. 1): 32

Spang A., Goericke-Pesch S., Schulz M., Brehm R. und Hoffmann B. (2009)

Expression of the androgen receptor during recrudescence of spermatogenesis in the dog
following downregulation with a GnRH-implant.

Reprod. Domest. Anim. 44 (Suppl. 1): 36

Goericke-Pesch S., Schulz M., **Spang A.** und Hoffmann B. (2009)

Expression of Endocrine Regulatory Factors during Recrudescence of Spermatogenesis
in the Dog.

Reprod. Domest. Anim. 44 (Suppl. 3): 76

Goericke-Pesch S., **Spang A.**, Schulz M., Özalp G., Bergmann M., Ludwig C.
und Hoffmann B. (2009)

Recrudescence of Spermatogenesis in the Dog Following Downregulation
Using a Slow Release GnRH Agonist Implant.

Reprod. Domest. Anim. 44 (Suppl. 2): 302–308

Goericke-Pesch S., Gentil M., **Spang A.**, Kowalewski M.P., Failing K.
und Hoffmann B. (2013)

Status of the down-regulated canine testis using two different GNRH agonist implants
in comparison with the juvenile testis.

Reproduction 146: 517–526

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	XVIII
Abbildungsverzeichnis	XXI
Abkürzungsverzeichnis	XXV
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Anatomie und Histologie des adulten Hodens	3
2.1.1 Lage und Morphologie des Hodens	3
2.1.2 Histologie des Hodens	4
2.1.2.1 Intertubuläre Zellen des Hodens	4
2.1.2.1.1 Leydigzellen	4
2.1.2.1.2 Leydig-like Cells	5
2.1.2.1.3 Myoidzellen	6
2.1.2.2 Intratubuläre Zellen des Hodens	6
2.1.2.2.1 Sertolizellen	7
2.1.2.2.2 Gonozyten	8
2.1.2.2.3 Spermatogonien	8
2.1.2.2.4 Spermatozyten	9
2.1.2.2.5 Spermatiden	11
2.2 Erscheinungsbild des postnatalen (juvenilen) Hodens	12
2.2.1 Descensus testis	12
2.2.2 Histologisches Erscheinungsbild	13

2.2.3	Steroidogenese	14
2.3	Ablauf der Spermatogenese	14
2.3.1	Stadien der Spermatogenese	14
2.3.1.1	Spermatogoniogenese	15
2.3.1.2	Spermatozytogenese	15
2.3.1.3	Spermiogenese	15
2.3.2	Spermatogenesezyklus	15
2.3.3	Keimepithelzyklus	16
2.3.4	Staging der Spermatogenese des Hundes	16
2.4	Neuroendokrine Regulation der Hodenfunktion	19
2.4.1	Gonadotropin Releasing Hormone	19
2.4.2	Gonadotropine	20
2.4.2.1	Luteinisierendes Hormon	20
2.4.2.2	Follikelstimulierendes Hormon	21
2.5	Testikuläre Hormonsynthese bei spezieller Berücksichtigung d. Situation b. Rüden	22
2.5.1	Steroidhormone	22
2.5.1.1	Testosteron	22
2.5.1.2	Östrogene	24
2.5.2	Sonstige hormonelle Wirkstoffe testikulären Ursprungs	26
2.5.2.1	Inhibin und Aktivin	26
2.5.2.2	Relaxin	28
2.5.2.3	Relaxin-like Faktor (RLF)/Insulin-like Peptide 3 (INSL3)	29
2.5.2.4	Oxytocin	30
2.5.2.5	Prostaglandine	30
2.5.2.6	GnRH-like Faktor	31
2.5.2.7	Ghrelin	32
2.6	Wirkung des Steroidhormons Testosteron	33
2.6.1	Genomische Wirkung	33
2.6.1.1	Androgenrezeptor	33
2.6.1.2	Abruf der genomischen Wirkung	34

2.6.2	Nicht-genomische Wirkung	35
2.7	Proliferation und Apoptose des Hodens	35
2.7.1	Proliferation	35
2.7.1.1	Ki-67	36
2.7.2	Apoptose	37
2.7.2.1	Apoptose im Rahmen der Spermatogenese	37
2.7.2.2	Apoptotische Signaltransduktion	38
2.7.2.2.1	Caspase-3	40
3	Material und Methode	42
3.1	Versuchstiere	42
3.1.1	Tierversuchsantrag	45
3.1.2	Versuchstierhaltung	45
3.2	Versuchsziel und -aufbau	45
3.2.1	Untersuchungsprotokolle und Probennahme	49
3.2.1.1	Aufnahmeuntersuchung	49
3.2.1.2	Blutprobennahme	50
3.2.1.3	Implantation eines GnRH-Analogons	51
3.2.1.3.1	„Gonazon®“ 18,5 mg-Implantat für Hunde	51
3.2.1.3.2	„Profact® Depot“	51
3.2.1.4	Explantation des GnRH-Analogons „Gonazon®“	51
3.2.1.5	Kontrolluntersuchungen	52
3.2.1.6	Orchidektomie	52
3.3	Aufarbeitung der Hoden	52
3.3.1	Probenaufarbeitung für die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen	53
3.3.1.1	Fixierung	53
3.3.1.1.1	Bouin´sche Lösung	53
3.3.1.1.2	Formol nach Lillie	53
3.3.1.2	Einbettung	53
3.3.1.3	Schnittpräparation	54

3.3.2	Probenaufarbeitung für die molekularbiologischen Untersuchungen .	54
3.3.2.1	Probenkonservierung	54
3.3.2.2	Extraktion von Gesamtprotein und RNA	54
3.3.2.2.1	Gesamtprotein	55
3.3.2.2.2	RNA-Extraktion	55
3.3.2.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung	56
3.3.2.3.1	Gesamtprotein	56
3.3.2.3.2	RNA	56
3.3.2.4	Herstellung einer Arbeitsverdünnung	57
3.3.2.4.1	Gesamtprotein	57
3.3.2.4.2	RNA	57
3.4	Histologische Untersuchung	57
3.4.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	57
3.4.1.1	Auswertung	58
3.5	Western Blot	60
3.5.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	61
3.5.2	Western Blot	64
3.5.3	Ponceau-S-Färbung	64
3.5.4	Immundetektion des Androgenrezeptors	65
3.6	Immunhistochemische Untersuchungen	66
3.6.1	Einfachfärbung	67
3.6.1.1	Androgenrezeptor (AR)	67
3.6.1.1.1	Immunhistochemische Darstellung	67
3.6.1.1.2	Auswertung	70
3.6.1.2	Proliferationsmarker Ki-67	73
3.6.1.2.1	Immunhistochemische Darstellung	73
3.6.1.2.2	Auswertung	74
3.6.1.3	Apoptosemarker Caspase-3 aktiviert	74
3.6.1.3.1	Immunhistochemische Darstellung	74
3.6.1.3.2	Auswertung	76
3.6.2	Doppelfärbung	76

3.6.2.1	Androgenrezeptor / Vimentin	76
3.6.2.1.1	Auswertung	78
3.7	TUNEL	78
3.7.1	ApopTag [®] Peroxidase Kit	79
3.7.1.1	Auswertung	81
3.8	Molekularbiologische Untersuchungen	81
3.8.1	Reverse Transkriptase - Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) . . .	81
3.8.1.1	DNase-Behandlung	81
3.8.1.2	Reverse Transkription	82
3.8.1.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	84
3.8.2	Isolierung der PCR-Produkte	87
3.8.2.1	Agarose-Gelelektrophorese	87
3.8.2.2	Gel-Extraktion	89
3.8.3	Reverse Transkriptase - quantitative real-time Polymerase-Ketten- reaktion (RT-qPCR)	90
3.8.3.1	Quantitative real-time PCR (qPCR) mit TaqMan [®] -Hydro- lyse-Sonden	91
3.8.3.1.1	Auswertung	94
3.9	Hormonanalyse	97
3.9.1	Testosteron	97
3.9.2	LH	97
3.9.3	FSH	98
3.10	Statistische Auswertung	98
3.10.1	Hormonanalytische Daten	99
3.10.2	Sonstige analytische Parameter	99
3.10.2.1	Datenanalyse I (DatA I)	99
3.10.2.2	Datenanalyse II (DatA II)	100
3.10.3	Signifikanzniveau	100
3.11	Fixierungen, Puffer und Lösungen	101
3.11.1	Allgemein	101
3.11.2	Probengewinnung und -konservierung	102

3.11.3	Histologie und Immunhistochemie	102
3.11.4	TUNEL	105
3.11.5	Proteinextraktion und Western Blot	106
3.11.6	RNA-Extraktion und PCR	109
3.12	Reagentien und Chemikalien (Hersteller/Lieferant)	111
3.13	Verbrauchsmaterialien (Hersteller/Lieferant)	116
3.14	Angewandte Gerätschaften (Hersteller/Lieferant)	118
3.15	Programme und Software	122
4	Ergebnisse	123
4.1	Tubuli seminiferi contorti	123
4.1.1	Zuordnung nach dem Stand der Spermatogenese	123
4.1.1.1	Versuchsgruppe „Gonazon®“	123
4.1.1.1.1	Gruppen DG A, DG B und DG C	124
4.1.1.1.2	Gruppe DG D	127
4.1.1.2	Versuchsgruppe „Kontrolle adult“	130
4.1.1.3	Versuchsgruppe „Profact®“	131
4.1.1.4	Versuchsgruppe „juvenil“	133
4.1.2	Flächeninhalt des Tubulusquerschnittes	135
4.1.2.1	Versuchsgruppe „Gonazon®“	135
4.1.2.2	Versuchsgruppen DG A, „Profact®“ und „juvenil“	136
4.2	Androgenrezeptor	138
4.2.1	Western Blot	138
4.2.2	Immunhistochemische Untersuchung	139
4.2.2.1	Identifizierung Androgenrezeptor (AR)-positiver tubulärer Zellen	139
4.2.2.2	Quantitativer Nachweis der Expression des Androgenrezeptors (AR) im Gesamthoden	142
4.2.2.2.1	Definition der erfassten AR-positiven Zellen	142
4.2.2.2.2	Expression des AR in den Sertolizellen (SZ)	142
4.2.2.2.2.1	Versuchsgruppe „Gonazon®“	144

4.2.2.2.2	Versuchsgruppen DG A, „Profact®“ und „ju- venil“	146
4.2.2.2.3	Expression des AR in den Spermatogonien	148
4.2.2.2.3.1	Versuchsgruppe „Gonazon®“	149
4.2.2.2.3.2	Versuchsgruppen DG A, „Profact®“ und „ju- venil“	149
4.2.2.2.4	Expression des AR in den Leydigzellen	151
4.2.2.2.4.1	Versuchsgruppe „Gonazon®“	151
4.2.2.2.4.2	Versuchsgruppen DG A, „Profact®“ und „ju- venil“	155
4.2.2.2.5	Expression des Androgenrezeptors (AR) in Ab- hängigkeit vom Tubulustyp	158
4.2.3	Expression des Androgenrezeptors (AR) auf mRNA-Ebene	160
4.2.3.1	RT-PCR	160
4.2.3.1.1	Sequenzierung	160
4.2.3.2	RT-qPCR	161
4.2.3.2.1	Versuchsgruppe „Gonazon®“	162
4.2.3.2.2	Versuchsgruppen DG A, „Profact®“ und „juvenil“	162
4.3	Ki-67	164
4.3.1	Immunhistochemische Untersuchung	164
4.3.1.1	Qualitativer Nachweis der Expression des Ki-67 in Kon- trollgewebe	164
4.3.1.2	Definition der erfassten Ki-67-positiven Zellen	164
4.3.1.3	Expression des Ki-67 in den Spermatogonien	166
4.3.1.3.1	Versuchsgruppe „Gonazon®“	166
4.3.1.3.2	Versuchsgruppen DG A, „Profact®“ und „juvenil“	169
4.3.1.4	Expression des Ki-67 in Abhängigkeit des Tubulustyps . .	170
4.4	Caspase-3	172
4.4.1	Expression der Caspase-3 auf Proteinebene	172
4.4.1.1	Histochemischer Methodenvergleich	172
4.4.2	Immunhistochemie aktivierte Caspase-3	174

4.4.2.1	Expression der aktivierten Caspase-3	175
4.4.2.1.1	Versuchsgruppe „Gonazon®“	176
4.4.2.1.2	Versuchsgruppen DG A, „Profact®“ und „juvenil“	176
4.4.3	Expression der Caspase-3 auf mRNA-Ebene	176
4.4.3.1	RT-PCR	176
4.4.3.1.1	Sequenzierung	177
4.4.3.2	RT-qPCR	177
4.4.3.2.1	Versuchsgruppe „Gonazon®“	178
4.4.3.2.2	Versuchsgruppe DG A, „Profact®“ und „juvenil“	179
4.5	Hormone	181
4.5.1	Testosteron	181
4.5.1.1	Versuchsgruppe „Gonazon®“	181
4.5.1.2	Versuchsgruppe „Profact®“	186
4.5.2	LH und FSH	186
4.5.2.1	Versuchsgruppe „Gonazon®“	186
4.5.2.2	Versuchsgruppe „Profact®“	186
5	Diskussion	188
5.1	Versuchsaufbau	188
5.2	Probengewinnung und -konservierung	190
5.2.1	Blutproben	190
5.2.2	Gewebeproben	190
5.3	Methodik	191
5.3.1	Hormonanalyse	191
5.3.2	Histologie	192
5.3.3	Western Blot	193
5.3.4	Immunhistochemie	194
5.3.4.1	Immunhistochemische Einfachfärbung	194
5.3.4.2	Immunhistochemische Doppelfärbung	195
5.3.5	TUNEL	196
5.3.6	RT-PCR und RT-qPCR	197

5.4	Ergebnisse	198
5.4.1	GnRH-Analogon „Gonazon®“	198
5.4.1.1	Erreichung einer hormonellen Downregulation	198
5.4.1.2	Testikuläre Rekrudeszenz	199
5.4.2	GnRH-Analogon „Profact® Depot“	211
5.4.3	Juveniler Hoden	212
6	Zusammenfassung	215
7	Summary	220
	Literaturverzeichnis	224
	Danksagung	271

Tabellenverzeichnis

2.1	Testosteronkonzentration im venösen peripheren Blutplasma adulter Rüden	23
2.2	17 β -Estradiolkonzentration im venösen peripheren Blutplasma adulter Rüden	25
2.3	Caspasen der Säugetiere	40
3.1	Zuordnung der Rüden zu Versuchsgruppen und Kastrationszeitpunkten . .	43
3.1	Fortsetzung	44
3.2	Mindestanforderungen an das Ejakulat	50
3.3	Klassifizierung nach Developmental Group (DG) A bis DG D	59
3.4	Klassifizierung nach Tubulustyp (tt) a bis tt d ₂	59
3.5	Zusammensetzung des Trenngels (7,5 %) zur SDS-PAGE	61
3.6	Zusammensetzung des Sammelgels (5 %) zur SDS-PAGE	62
3.7	Belegung der Probetaschen für die Gelelektrophorese	63
3.8	Zusammensetzung der „Working Strength TdT-Enzyme“-Lösung	80
3.9	Zusammensetzung des DNase-Mixes	82
3.10	Temperaturprotokoll zur DNase-Behandlung	82
3.11	Zusammensetzung des RT-Mastermixes	83
3.12	Temperaturprotokoll zur reversen Transkription	84
3.13	Nukleotidsequenzen der in der PCR verwendeten forward / reverse Primer (Canis lupus familiaris)	85
3.14	Zusammensetzung des PCR-Prä-Mix	86
3.15	Zusammensetzung des PCR-Primer-Mix	86
3.16	Temperaturprotokoll der PCR	87
3.17	Belegung der Probetaschen für die Agarose-Gelelektrophorese	89

3.18	Nukleotidsequenzen der in der qPCR verwendeten forward / reverse Primer (<i>Canis lupus familiaris</i>) und TaqMan [®] -Hydrolyse-Sonden	93
3.19	Zusammensetzung des qPCR-Mastermixes	94
3.20	Temperaturprotokoll der qPCR	94
4.1	Zuordnung der Hunde der Versuchsgruppe „Gonazon [®] “ in die Develop- mental Group (DG) A - DG D	123
4.2	Prozentuale Verteilung der Tubuli seminiferi contorti nach Tubulustyp (tt) a - tt d ₂ der Versuchsgruppe „Gonazon [®] “ (DG A - DG C)	125
4.3	Prozentuale Verteilung der Tubuli seminiferi contorti nach Tubulustyp (tt) a - d ₂ und Stage (S) I - S VIII der Versuchsgruppe „Gonazon [®] “ (DG D) .	128
4.4	Prozentuale Verteilung der Tubuli seminiferi contorti nach Tubulustyp (tt) a - d ₂ und Stage (S) I - S VIII der Versuchsgruppe „Kontrolle adult“ . . .	130
4.5	Prozentuale Verteilung der Tubuli seminiferi contorti nach Tubulustyp (tt) a - tt d ₂ der Versuchsgruppe „Profact [®] “	132
4.6	Prozentualer Anteil großer und kleiner Gonozyten und deren Verteilung auf die intratubulären Positionen (zentral, basal) in den Tubuli seminiferi contorti der Versuchsgruppe „juvenil“	134
4.7	Mittlerer Flächeninhalt eines Tubulus seminiferus contortus-Querschnittes .	135
4.8	Gesamtzahl und Anzahl Androgenrezeptor-positiver sowie AR-pos. basal- ständiger Sertolizellen pro Tubulus seminiferus contortus-Querschnitt . . .	143
4.9	Gesamtzahl und Anzahl Androgenrezeptor-positiver Spermatogonien pro Tubulus seminiferus contortus-Querschnitt	148
4.10	Prozentualer Anteil Androgenrezeptor-positiver Leydigzellen und deren Ver- teilung auf die Färbeintensitäten (FI) (1), FI 1 und FI 2	152
4.11	Gesamtzahl und Anzahl Androgenrezeptor-positiver Spermatogonien pro Tubulus seminiferus contortus-Querschnitt sowie mittlere Färbeintensität der AR-pos. Spg in Abhängigkeit des Tubulustyps (tt) a - tt d ₂	158

4.12 Gesamtzahl und Anzahl Androgenrezeptor-positiver und AR-pos. basal-ständiger Sertolizellen pro Tubulus seminiferus contortus-Querschnitt sowie mittlere Färbeintensität der AR-pos. SZ in Abhängigkeit der Tubulustypen (tt) a bis tt d ₂	159
4.13 Ratio der relativen Genexpression des testikulären Androgenrezeptors . . .	161
4.14 Gesamtzahl und Anzahl Ki-67-positiver Spermatogonien pro Tubulus seminiferus contortus-Querschnitt	167
4.15 Gesamtzahl und Anzahl Ki-67-positiver Spermatogonien pro Tubulus seminiferus contortus-Querschnitt in Abhängigkeit des Tubulustyps (tt) a - tt d ₂ .	170
4.16 Mittlere Anzahl aktivierte Caspase-3-positiver Zellen pro 36 Gesichtsfeldern (400 x)	176
4.17 Ratio der relativen Genexpression der testikulären Caspase-3	178
4.18 Mittlere periphere Testosteronkonzentration der Versuchsgruppe „Gonazon®“ (Developmental Group (DG) A - DG D; DG D = 17 Tiere) vor Implantation von „Gonazon®“ im Vergleich mit den Zeitpunkten 4. und 8. Woche post implantationem sowie Implantatentfernung	181
4.19 Mittlere periphere Testosteronkonzentration der jeweiligen Rüden der Versuchsgruppe „Gonazon®“ (Developmental Group (DG) A - DG D; DG D = 17 Tiere) vor Implantation von „Gonazon®“ im Vergleich mit Woche 1 bis Woche 24 post explantationem	183
4.19 Fortsetzung	184
4.20 LH-Konzentration im Blutplasma in ng/ml zu den verschiedenen Entnahmezeitpunkten, Gruppenmittelwerte (entnommen GENTIL, 2012)	187
4.21 FSH-Konzentration im Blutplasma in ng/ml zu den verschiedenen Entnahmezeitpunkten, Gruppenmittelwerte (entnommen GENTIL, 2012)	187
5.1 Vergleichende Übersicht über die prozentuale Verteilung der geringgradig modifizierten Stages (S) I - S VIII nach RUSSELL et al. (1990b) bei den Rüden der Versuchsgruppe „Gonazon®“ DG D und der „Kontrolle adult“ sowie den in der Literatur (RUSSELL et al., 1990b, FOOTE et al., 1972) vorliegenden Ergebnisse	202

Abbildungsverzeichnis

2.1	Stadien des caninen Keimepithelzyklus nach RUSSELL et al. (1990b) (Reprinted with permission of Cache River Science, an imprint of Quick Publishing, LC, phone 314-432-3435, fax 314-993-4485, Email Cacheriverpress@sbcglobal.net.)	18
3.1	Versuchsaufbau	48
3.2	Vermessung eines Tubulus seminiferus contortus zur Feststellung des tubulären Flächeninhaltes	70
3.3	Färbeintensitäten der Sertolizellen	71
3.4	Färbeintensitäten der Spermatogonien	72
3.5	Färbeintensitäten der Leydigzellen	72
4.1	Prozentuale Verteilung der Tubuli seminiferi contorti nach Tubulustyp (tt) a - tt d ₂ der Versuchsgruppe „Gonazon®“ (DG A - DG C)	126
4.2	Prozentuale Verteilung der Tubuli seminiferi contorti nach Tubulustyp (tt) a - d ₂ und Stage (S) I - S VIII der Versuchsgruppe „Gonazon®“ (DG D) .	129
4.3	Prozentuale Verteilung der Tubuli seminiferi contorti nach Tubulustyp (tt) a - d ₂ und Stage (S) I - S VIII der Versuchsgruppe „Kontrolle adult“ . . .	131
4.4	Tubulus seminiferus contortus der Versuchsgruppe „Profact®“	132
4.5	Tubulus seminiferus contortus der Versuchsgruppe „juvenil“	133
4.6	Mittlerer Flächeninhalt eines Tubulus seminiferus contortus-Querschnittes der Versuchsgruppen „Gonazon®“ und „Kontrolle adult“	136
4.7	Mittlerer Flächeninhalt eines Tubulus seminiferus contortus-Querschnittes der Versuchsgruppen „Gonazon®“ (DG A), „Profact®“ und „juvenil“	137

4.8	Western Blot zur Überprüfung der Spezifität des in der Immunhistochemie zur Darstellung des Androgenrezeptors verwendeten Antikörpers AR(N-20):sc-816	138
4.9	Isotypenkontrolle und immunhistochemischen Doppelfärbung Androgenrezeptor/Vimentin im caninen Hodengewebe	139
4.10	Immunhistochemische Doppelfärbung Androgenrezeptor/Vimentin der Versuchsgruppe „Gonazon [®] “ (DG A), „Profact [®] “ und „juvenil“	140
4.10	Fortsetzung	141
4.11	Immunhistochemische Färbung des Androgenrezeptors	142
4.12	Gesamtzahl Sertolizellen pro Tubulus seminiferus contortus-Querschnitt der Versuchsgruppen „Gonazon [®] “ und „Kontrolle adult“	144
4.13	Anzahl Androgenrezeptor-positiver sowie AR-pos. basalständiger Sertolizellen pro Tubulus seminiferus contortus-Querschnitt der Versuchsgruppen „Gonazon [®] “ und „Kontrolle adult“	145
4.14	Gesamtzahl Sertolizellen pro Tubulus seminiferus contortus-Querschnitt der Versuchsgruppen „Gonazon [®] “ (DG A), „Profact [®] “ und „juvenil“	146
4.15	Anzahl Androgenrezeptor-positiver sowie AR-pos. basalständiger Sertolizellen pro Tubulus seminiferus contortus-Querschnitt der Versuchsgruppen „Gonazon [®] “ (DG A), „Profact [®] “ und „juvenil“	147
4.16	Gesamtzahl und Anzahl Androgenrezeptor-positiver Spermatogonien pro Tubulus seminiferus contortus-Querschnitt der Versuchsgruppen „Gonazon [®] “ und „Kontrolle adult“	150
4.17	Gesamtzahl und Anzahl Androgenrezeptor-positiver Spermatogonien pro Tubulus seminiferus contortus-Querschnitt der Versuchsgruppen „Gonazon [®] “ (DG A) und „Profact [®] “	151
4.18	Prozentualer Anteil der Androgenrezeptor-positiven Leydigzellen und der AR-pos. LZ in Färbeintensität FI(1) sowie der AR-pos. LZ in Färbeintensität FI1 und FI2 der Versuchsgruppen „Gonazon [®] “ und „Kontrolle adult“	153
4.18	Fortsetzung	154
4.18	Fortsetzung	155

4.19	Prozentualer Anteil der Androgenrezeptor-positiver Leydigzellen sowie der AR-pos. LZ in den Färbeintensitäten (FI) (1), FI 1 und FI 2 der Versuchsgruppen „Gonazon®“ (DG A), „Profact®“ und „juvenil“	156
4.19	Fortsetzung	157
4.20	Konventionelle RT-PCR zum qualitativen Nachweis der Androgenrezeptor-mRNA unter Verwendung eines 100bp-DNA-Markers	160
4.21	Ratio der relativen Genexpression des testikulären Androgenrezeptors der Versuchsgruppen „Gonazon®“ und „Kontrolle adult“	162
4.22	Ratio der relativen Genexpression des testikulären Androgenrezeptors der Versuchsgruppen „Gonazon®“ (DG A), „Profact®“ und „juvenil“	163
4.23	Isotypenkontrolle und immunhistochemischen Färbung des Ki-67 im caninen Intestinalgewebe	164
4.24	Isotypenkontrolle und immunhistochemische Färbung des Ki-67 im caninen Hodengewebe	165
4.25	Gesamtzahl und Anzahl Ki-67-positiver Spermatogonien pro Tubulus seminiferus contortus-Querschnitt der Versuchsgruppen „Gonazon®“ und „Kontrolle adult“	168
4.26	Gesamtzahl und Anzahl Ki-67-positiver Spermatogonien pro Tubulus seminiferus contortus-Querschnitt der Versuchsgruppen „Gonazon®“ (DG A) und „Profact®“	169
4.27	Prozentualer Anteil an Tubuli seminiferi contorti-Querschnitten mit Ki-67-positiven Spermatogonien bezogen auf die Tubulustypen (tt) a bis tt d ₂ . . .	171
4.28	Negativkontrollen des Methodenvergleiches von Immunhistochemie der aktivierten Caspase-3 und TUNEL (ApopTag®) in einem als Kontrollgewebe verwendeten caninen Lymphknotens	172
4.29	Methodenvergleich von Immunhistochemie der aktivierten Caspase-3 und TUNEL (ApopTag®) in einem als Kontrollgewebe verwendeten caninen Lymphknoten	173
4.30	Immunhistochemische Negativkontrolle der aktivierten Caspase-3 im caninen Hoden ohne und mit unspezifischen Farbreaktionen	174

4.31	Immunhistochemische Färbung der aktivierten Caspase-3 im caninen Hoden mit als positiv bewerteter Farbreaktion	175
4.32	Konventionelle RT-PCR zum qualitativen Nachweis der Caspase-3-mRNA unter Verwendung eines DNA-100bp-Markers	177
4.33	Ratio der relativen Genexpression der testikulären Caspase-3 der Versuchsgruppen „Gonazon®“ und „Kontrolle adult“	179
4.34	Ratio der relativen Genexpression der testikulären Caspase-3 der Versuchsgruppen „Gonazon®“ (DG A), „Profact®“ und „juvenil“	180
4.35	Mittlere periphere Testosteronkonzentration der Versuchsgruppe „Gonazon®“ (Developmental Group (DG) A - DG D; DG D = 17 Tiere) vor Implantation von „Gonazon®“ im Vergleich mit den Zeitpunkten 4. und 8. Woche post implantationem sowie Implantatentfernung	182
4.36	Mittlere periphere Testosteronkonzentration der jeweiligen Rüden der Versuchsgruppe „Gonazon®“ (Developmental Group (DG) A - DG D; DG D = 17 Tiere) vor Implantation von „Gonazon®“ im Vergleich mit Woche 1 bis Woche 24 post explantationem	185

Abkürzungsverzeichnis

5 α -DHT	5 α -Dihydrotestosteron
6-FAM	6-Carboxy-Fluorescein
17 β -HSD	17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase
Δ^5 -3 β -HSD	Δ^5 -3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase
A	Flächeninhalt
AB	Avidin-Biotin
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
ABP	Androgen-binding Protein
ActRII/ActRIIB	Aktivinrezeptoren Subtypen II/IIB
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
ANOVA	Einfaktorielle Varianzanalyse
Apaf-1	Apoptosis-inducing factor-1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AR	Androgenrezeptor / androgen receptor
ARE	Androgen Response Element
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
BHS	Blut-Hoden-Schranke
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CA	control adult
CAD	Caspase-activated Deoxyribonuclease

cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Casp-3	Caspase-3
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CREB-Protein	cAMP-Response Element-binding Protein
COX-1	Cyclooxygenase-1
<i>CP</i>	Crossing Point
C_T	Threshold Cycle
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DatA I / II	Datenanalyse I / II
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DBD	DNA-binding Domain
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DG	Develomental Group / developmental group
DISC	Death-inducing Signaling Complex
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dUTP	2'-Deoxyuridine, 5'-Triphosphate
D-Box	Dimerization-Box
<i>E</i>	Reaktionseffizienz
EDS	Ethandimethansulfonat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EIA	Enzym-Immuno-Assays
eldSpt	elongierende Spermatide / elongating spermatid
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
eltSpt	elongierte Spermatide / elongated spermatid
EMA	European Medicines Agency
ext KWT	exakter Kruskal-Wallis-Test
ext WMWT	exakter Wilcoxon-Mann-Whitney-Test

ER	endoplasmatisches Retikulum
FADD	Fas-associated Protein with Death Domain
FasL	Fas Ligand
FET	Fluoreszenz-Energietransfer
FI (SI)	Färbeintensität (staining intensity)
for	forward
FP	Prostaglandin F-Rezeptor
FSH	Follikelstimulierendes Hormon follicle stimulation hormone
FSH-R	FSH-Rezeptor
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GHS-Rezeptor	Growth Hormon Secretagogue-Rezeptor
GnRH	Gonadotropin-Releasing Hormon
GZ	Gonozyt/en groß
gz	Gonozyt/en klein
h	Stunde
hCG	humanes Choriongonadotropin
HOS-Test	hypoosmotischer Schwelltest
HRP	Horseradish Peroxidase
HSP	Heat Shock Protein
ICC	Immuncytochemistry
ICE	Interleukin-1 β -converting Enzyme
IHC	Immunhistochemie / immunohistochemistry
IK	Isotypenkontrolle
INSL3	Insulin-like Peptide 3
ISH	In Situ Hybridisierung
kDa	Kilodalton
KGW	Körpergewicht
KWT	Kruskal-Wallis-Test
LAN	Linker-Arm-modifiziertes-Nukleotid

LBD	Ligand-binding Domain
LC (LZ)	Leydig cell (Leydigzelle)
Ley-I-L	Leydig insulin-like
LGR7	Leucine-rich Repeat-containing G protein-coupled Receptor 7
LGR8	Leucine-rich Repeat-containing G Protein-coupled Receptor 8
LH	Luteinisierendes Hormon / luteinizing hormone
LHRH	Luteinisierendes Hormon Releasing Hormon
LZ (LC)	Leydigzelle (Leydig cell)
M	Molarität
mA	Milliampere
MAP	Mitogen-Activated Protein
max.	maximal
min	Minute
min.	minimal
mRNA	messenger RNA
n	Chromosomen
N	Äquivalentkonzentration
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsalz
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEL	Nick End Labeling
NK	Negativkontrolle
n. s.	nicht signifikant
NTD	N-terminal Domain
<i>p</i>	Wahrscheinlichkeit
p. c.	post coitum
p. expl.	post explantationem /post explantation
p. i.	post implantationem
p. p.	post partum
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PBST	phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween [®] 20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion / polymerase chain reaction
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGF _{2α}	Prostaglandin F _{2α}
pH	potentia Hydrogenii
pKI-67	Protein Ki-67
PLAD	Pre-ligand Binding Assembly Domain
pSpz	sekundäre Spermatozyte
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PZ	peritubuläre Zelle
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion / quantitative polymerase chain reaction
<i>R</i>	Ratio
<i>r_s</i>	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman
rev	reverse
RIA	Radioimmunassay
RLF	Relaxin-like Faktor
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
rSpt	runde Spermatide / round spermatid
RT	reverse Transkriptase / reverse transcriptase
RT-PCR	reverse Transkriptase - Polymerase-Kettenreaktion / reverse transcriptase - polymerase chain reaction
RT-qPCR	Reverse Transkriptase - quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion / reverse transcriptase - qualitative real-time polymerase chain reaction
Rxfp1	Relaxin-like family peptide receptor 1
s	Sekunde
S	Stage
SC (SZ)	Sertoli cell (Sertolizelle)

SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Sodiumdodecylsulfat-Poly- acrylamidgelelektrophorese
SE	Standard error
SEM	Standard error of the mean
SF	Streufaktor
SI (FI)	staining intensity (Färbeintensität)
Spc (Spz)	spermatocyte (Spermatozyte)
Spg	Spermatogonien / spermatogonia
Spz (Spc)	Spermatozyte (spermatocyte)
Src	sarcom
sSpz	sekundäre Spermatozyte
StAR Protein	Steroidogenic Acute Regulatory Protein
SZ (SC)	Sertolizelle (Sertoli cell)
T	Testosteron / testosterone
T _A	Annealing-Temperatur
TAMRA	6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TdT	Terminale Deoxynucleotidyl Transferase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TGF β	Transforming Growth Factor β
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor
TNF-R1	TNF-Receptor 1
TRAIL-R 1 / 2	TNF-related Apoptosis-inducing Ligand Receptor 1 / 2
tt	Tubulustyp / type of tubulus
TUNEL	TdT-mediated dUTP-Biotin Nick End Labeling
U	Umdrehung

UV	Ultraviolett
V	Volt
Vim	Vimentin
VK	Variationskoeffizient absolut
W	Watt
\bar{x}	arithmetischer Mittelwert
$\bar{x}_{geom.}$	geometrischer Mittelwert

1 Einleitung

Mit Zulassung des GnRH-Analogons Deslorelin [„Suprelorin®“ ad us. vet. (Virbac S. A., Frankreich)] im Jahr 2007 hat ein Präparat, welches der „Erzielung einer vorübergehenden Unfruchtbarkeit bei gesunden, nicht kastrierten, geschlechtsreifen Rüden“ (EMA, last updated 05/06/2012) dient, als willkommene Alternative zur chirurgischen Kastration in die veterinärmedizinische Praxis Einzug gehalten.

Die nicht-chirurgische Kastration beruht auf einer Downregulation der germinativen und endokrinen Hodenfunktion, herbeigeführt durch eine Desensibilisierung der hypophysären GnRH-Rezeptoren nach Verabreichung eines GnRH-Agonisten in Form eines Implantates mit verzögerter Wirkstofffreisetzung. Die daraus resultierende Downregulation hat sich – unabhängig von der Art des verwendeten Agonisten – in zahlreichen Studien als voll-reversibel erwiesen, wobei diese Feststellung insbesondere durch Erfassung der peripheren Testosteronkonzentrationen sowie der Ejakulatqualität verifiziert wurde (VICKERY et al., 1984; CAVITTE et al., 1988; INABA et al., 1996; RIESENBECK et al., 2002; LUDWIG et al., 2009).

Vorliegende Arbeit befasst sich mit der Frage, wie sich der Effekt der Downregulation auf testikulärer Ebenen manifestiert und insbesondere wie sich der Vorgang der Rekrudescenz, d. h. die Aufregulation der germinativen und endokrinen Hodenfunktion, darstellt. Aus der hiesigen Arbeitsgruppe unter Mitautorenschaft der Verfasserin vorliegender Dissertation sind dazu bisher drei Arbeiten erschienen, wobei neben Aspekten der Rekrudescenz der Spermatogenese (GOERICHKE-PESCH et al., 2009) insbesondere Fragen der Down- und Upregulation des steroidogenen Apparates (GENTIL et al., 2012; GOERICHKE-PESCH et al., 2013) im Vordergrund standen.

1. Einleitung

Im Hinblick auf das Ziel vorliegender Arbeit erfolgten neben der Feststellung der tubulären Veränderungen und der Klassifizierung des Keimepithels auch die Quantifizierung der testikulären Proliferation und Apoptose. Ein weiteres Bestreben galt der qualitativen und quantitativen Erfassung des testikulären Androgenrezeptors als zentrale Schaltstelle zur Vermittlung der androgenen Wirkung. Dieses wurde von der Bestimmung der peripheren Testosteronkonzentration begleitet.

Die Erfassung der entsprechenden Parameter am juvenilen Hoden ergänzten zudem die Untersuchungen.

2 Literaturübersicht

2.1 Anatomie und Histologie des adulten Hodens

2.1.1 Lage und Morphologie des Hodens

Allgemeine als auch tierartspezifische Angaben zu Lage und Morphologie des Hodens finden sich in zahlreichen Textbüchern (CERVENY et al., 1999; GASSE, 1999; LIEBICH, 1999b; SINOWATZ, 2001; WEITZE, 2001a):

Beim Hund sind die Hoden von annähernd kugeliger Gestalt. Ihre Lage in den an der Bildung des Skrotums und dem Processus vaginalis beteiligten Hodenhüllen ist durch eine vertikale Schrägstellung ihrer Längsachse mit cranioventraler Ausrichtung der Extremitas capitata testis gekennzeichnet. Der Hoden selbst wird von der Lamina visceralis der Tunica vaginalis überzogen, welche fest mit der bindegewebigen Tunica albuginea testis verwachsen ist. Die Tunica albuginea testis entlässt radiär bindegewebige Septen, welche in der Längsachse des Testis zusammenlaufend das Mediastinum testis bilden und dabei das Gonadenparenchym in Lobuli testis segmentieren. Die in den Lobuli testis gelegenen keimzellbildenden Tubuli seminiferi contorti nehmen ihren Anfang in der Peripherie des Gonadenparenchyms und weisen eine starke Schlängelung auf. Tiefer im Hodeninneren gehen sie in die gestreckten Tubuli seminiferi recti über, welche in das im Mediastinum testis gelegene Rete testis münden. Aus dem Rete testis treten im Bereich der Extremitas capitata testis beim Hund circa 15 bis 16 Ductuli efferentes durch die Tunica albuginea und bilden das mit dem Testis fest verwachsene Caput epididymidis. Die Ductuli efferentes verbinden sich zu dem eng geschlungenen Ductus epididymidis, welcher beim Rüden eine Gesamtlänge von fünf bis acht Metern aufweist.

Wie für verschiedene Carnivoren beschrieben (KENAGY und TROMBULAK, 1986), ist auch beim Hund die Masse der Hoden im Vergleich zur Körpermasse relativ gering (WOODALL und JOHNSTONE, 1988). JACKSON und CAPPIELLO (1964) geben für Beagle-Rüden im Alter von 8 bis 38 Monaten ein relatives Hodengewicht von 0,92 g/kg Körpergewicht (KGW) bis 2,13 g/kg KGW an. Das absolute mittlere testikuläre Gewicht adulter, sexuell maturer Beagle-Rüden benennen EWING et al. (1979) mit $8,46 \pm 1,19$ g. Die pro Gramm Hodengewicht ermittelte Gesamtlänge der caninen Tubuli seminiferi geben BASCOM und OSTERUD (1925) mit 22,9 m bis 25,8 m an und benennen deren Anteil am testikulären Parenchym, exklusive der Tunica albuginea und dem Mediastinum testis, mit 92,2 % bis 94,2 %. Nach WOODALL und JOHNSTONE (1988) liegt beim Hund der prozentuale Anteil von Keimepithel und intratubulärem Lumen bei $84,8 \pm 0,58$ % ($\bar{x} \pm \text{SEM}$).

2.1.2 Histologie des Hodens

2.1.2.1 Intertubuläre Zellen des Hodens

2.1.2.1.1 Leydigzellen Die Endocrinocyti interstitiales des Hodens werden entsprechend ihrem Entdecker, dem deutschen Zoologen und Histologen Franz von Leydig (1821-1908), auch als Leydigzellen bezeichnet (SCHNEIDER, 2012).

Die Leydigzellen weisen sowohl in ihrem Vorkommen als auch ihrem morphologischen Erscheinungsbild deutliche speziesspezifische Unterschiede auf (DÖCKE, 1994c). So besitzt der adulte Hund eine außerordentlich große Anzahl maturer Leydigscher Zwischenzellen in wenig intertubulärem Bindegewebe (DE KRETZER und KERR, 1988). KOTHARI et al. (1972) und KOTHARI et al. (1978) benennen den testikulären Anteil der Leydigzellen beim Rüden mit 15,7 % bzw. 15,40 %.

Die Größe der maturen caninen Leydigzelle variiert zwischen 14 µm und 18 µm (SANTOS et al., 2010). Eine umfangreiche, auf licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen basierende Beschreibung ihrer Zellmorphologie findet sich bei CONNELL und CHRISTENSEN (1975), in welcher zwischen der hoch und der weniger entwickelten caninen Leydigzelle unterschieden wird:

So ist die hoch entwickelte mature Leydigzelle von großer polygonaler Gestalt. Ihr Nukleus wird im Bereich der Kernhülle von Heterochromatin gesäumt und weist ein Kernkörperchen auf, wobei SANTOS et al. (2010) jedoch auch von bis zu zwei Nukleoli berichten. Das Zytoplasma der in Gruppen vorliegenden caninen Leydigzellen besitzt eine typische Anordnung des agranulären endoplasmatischen Retikulums (ER); letzteres steht mit dem im Bereich des Kerns und der Plasmamembran gelegenen granulären ER in direktem Kontakt. Zudem findet sich eine Vielzahl von 5 nm-Mikrofilamenten, welche diverse zytoplasmatische Organellen sowie die 0,5 µm bis 10,0 µm großen Lipidvakuolen umgeben. Nahe der Fettvakuolen sind die in der Regel tubulären, in Form und Größe variierenden Mitochondrien lokalisiert. Der Golgiapparat ist juxtanukleär gelegen. Freie Ribosomen, Polysomen, den Lysosomen und Peroxisomen ähnelnde membrangebundene Körperchen, multivesikuläre und glykogenhaltige Körperchen, Mikrotubuli sowie ein einzelnes Zilium stellen weitere zytoplasmatische Organellen der hoch entwickelten Leydigzelle dar.

Die weniger entwickelte Leydigzelle entspricht grundsätzlich diesem Aufbau; Unterschiede liegen jedoch in der reduzierten Ausprägung ihrer Gestalt sowie in dem nur in geringem Maße vorhandenen tubulären oder zisternösen agranulären ER.

ZIRKIN et al. (1980) berichten über eine hoch signifikant positive, lineare Korrelation zwischen der mittleren Volumendichte des agranulären ER der caninen Leydigzelle und der Sekretion des Testosterons.

Die caninen Leydigzellen stehen nach CONNELL und CHRISTENSEN (1975) über Gap Junctions, Septate-like Junctions und auch rudimentäre Desmosomen miteinander in Verbindung. VON BOMHARD et al. (1978), welche dagegen eine Beteiligung von Desmosomen oder ähnlichen Kontaktstrukturen nicht aufzeigen konnten, wiesen beim Hund lediglich eine enge Verzahnung der Leydigschen Zwischenzellen durch Mikrovilli nach.

2.1.2.1.2 Leydig-like Cells Die zwischen Myoidzellen und lymphatischem Endothel befindlichen, sowohl als Einzelzellen als auch als Synzytium vorliegenden Leydig-like Cells können neben dem hoch- auch ein minderentwickeltes Erscheinungsbild aufweisen und stel-

len ein charakteristisches Merkmal des caninen testikulären Interstitiums dar (CONNELL und CHRISTENSEN, 1975).

Eine mögliche Beteiligung der caninen Leydig-like Cell an der Androgensynthese ist ungeklärt (CONNELL und CHRISTENSEN, 1975).

2.1.2.1.3 Myoidzellen Gemeinsam mit den Endothelzellen bilden die peritubulären, zwischen zwei Lagen extrazellulärer Matrix gelegenen Myoidzellen die testikuläre Lamina propria (HADLEY und DYM, 1987). Diese weist beim Hund speziesspezifisch eine einzelne Lage an Myofibroblasten auf (CHRISTL, 1990).

CONNELL und CHRISTENSEN (1975) beschreiben die canine Myoidzelle wie folgt:

Die spindelförmigen, in der Regel aneinander angrenzenden oder sich überlappenden Zellen besitzen oftmals lange zytoplasmatische Ausläufer. Ihr Zytoplasma enthält wenig agranuläres und granuläres ER, meist stabförmige Mitochondrien mit lamellenartigen Cristae, einen juxtanukleären Golgiapparat, kleine Lipidvakuolen, glatte und behüllte Vesikel sowie an Peroxisomen erinnernde membrangebundene Vesikel. Mikropinozytotische Vesikel finden sich sowohl im Bereich der interstitiellen als auch der lumenwärtigen Oberfläche der Myoidzellen. Desweiteren sind 5-nm Filamente, Zentriolen und manchmal auch ein einzelnes Cilium im Zytoplasma gelegen.

Das Zytoskelett der kontraktilen peritubulären Myoidzelle setzt sich speziesspezifisch aus Aktin, Myosin sowie Desmin und/oder Vimentin zusammen (MAEKAWA et al., 1996).

2.1.2.2 Intratubuläre Zellen des Hodens

Bei den intratubulären Zellen des Hodens handelt es sich zum einen um die somatischen Sertolizellen, zum anderen um die in verschiedenen Entwicklungsstadien befindlichen Keimzellen (LIEBICH, 1999b). Letztere weisen in ihrer Gesamtheit einen mit zunehmendem Alter signifikant abnehmenden prozentualen Volumenanteil am caninen Hodengewebe auf (LOWSETH et al., 1990).

2.1.2.2.1 Sertolizellen Die im Jahre 1865 erstmals beschriebenen Sertolizellen sind nach ihrem Entdecker, dem italienischen Physiologen Enrico Sertoli (1842-1910), benannt (WESSEL, 2011). Aufgrund ihrer funktionellen Bedeutung für die Keimzellen sowie das gesamte Keimepithel werden sie allgemein auch als „Stütz-“, „Ammen-“ oder „Nährzellen“ bezeichnet (LIEBICH, 1999a).

Nach RUSSELL et al. (1990c) nehmen beim Rüden die Sertolizellen, bezogen auf die Tubuli seminiferi exklusive Lumen und intraepitheliale Bereiche, einen Volumenanteil von 23,9 % ein. Ihre mittlere absolute Anzahl geben die Autoren mit $43,4 \cdot 10^6$ Zellen pro cm^3 Hoden an. Die mature Sertolizelle zeichnet sich durch ihre Größe sowie ihr besonderes morphologisches Erscheinungsbild aus (RUSSELL, 1998). RUSSELL et al. (1990c) benennen das mittlere Volumen der caninen Stützzelle mit $5012,5 \mu\text{m}^3$. Ihr im Zytoplasma nahe bzw. an der tubulären Basalmembran gelegener Zellkern ist von dreieckiger bis irregulärer Gestalt und weist neben einem lediglich geringen Chromatingehalt ein markantes Kernkörperchen auf (FOOTE et al., 1972). Zudem finden sich intrazytoplasmatisch Mitochondrien sowie eine Fülle von glattem ER (RUSSELL, 1998) und Golgi-Elementen (BARDIN et al., 1988). Die der Basalmembran breit aufsitzende Zelle zieht säulenförmig Richtung Lumen des Tubulus seminiferus contortus, wobei ihre lateralen Seitenflächen eine den vorherrschenden Keimzellstadien entsprechende adaptive Gestalt aufweisen (RUSSELL, 1998). Diese außergewöhnliche Formvariabilität bei gleichzeitiger Stabilität der Zelle wird durch das aus Mikrotubuli, Intermediärfilamenten und Aktin bestehende Zytoskelett gewährleistet (GRISWOLD und RUSSELL, 1998). Aktin ist an der Ausbildung einer Vielzahl permanenter oder zyklisch auftretender regionaler Spezialisierungen beteiligt, welche sowohl der interzellulären Kommunikation als auch der räumlichen Organisation der Keimzellen im Keimepithel dienen (GRISWOLD und RUSSELL, 1998). Eine Teilung des Keimepithels in ein basales und ein lumbinales Kompartiment erfolgt durch die Blut-Hoden-Schranke (DYM und FAWCETT, 1970). Diese wird nach CAMBROSIO MANN et al. (2003) beim Hund ausschließlich durch die interzellulären Tight Junctions benachbarter Sertolizellen gebildet. Während der basale Teil des Keimepithels ausschließlich Spermatogonien und die frühen präleptotänen Spermatozyten beherbergt, befinden sich im adlumbinalen Teil alle weiteren Zellstadien der Spermatogenese (DYM und FAWCETT, 1970). Die Blut-Hoden-Schranke

verhindert den Übertritt immunkompetenter Zellen sowie schädlicher Moleküle in den lumenwärtigen Teil des Keimepithels und gewährleistet zeitgleich eine für die Entwicklung der Keimzellen förderliche adluminale Umgebung (LIEBICH, 1999a).

2.1.2.2.2 Gonozyten Die im fetalen und neonatalen Keimepithel befindlichen Gonozyten stellen die Vorläuferzellen der Spermatogonien dar (CLERMONT und PEREY, 1957). Sie gehen aus der sich differenzierenden primordialen Keimzellen hervor (RICHARDS et al., 1999; CULTY, 2009). Morphologisch sind die vorwiegend zentral in den primitiven Tubuli seminiferi contorti gelegenen Gonozyten von großer, ovoid bis runderlich Gestalt und besitzen einen ebenfalls großen Nukleus mit ein bis zwei charakteristischen Nukleoli (BAILLIE, 1964).

2.1.2.2.3 Spermatogonien Bei den Spermatogonien handelt es sich um die aus den Primordialkeimzellen über den Entwicklungsstand der Gonozyten hervorgehenden testikulären Keimzellen, welche die Spermatogenese einleiten (DE ROOIJ und RUSSELL, 2000). Die im basalen Kompartiment des Keimepithels lokalisierten Zellen werden aufgrund ihrer veränderlichen Morphologie und Lage im Allgemeinen in Typ A-, I (Intermediär)- und B-Spermatogonien unterschieden, wobei die Typ A-Spermatogonien der Basalmembran direkt aufliegen und im Gegensatz zu den I- oder B-Spermatogonien während des gesamten Keimepithelzyklus zu beobachten sind (LIEBICH, 1999a). Alle Tochterzellen der Typ A-Spermatogonie sind während der Spermatozytogenese sowie dem Großteil der Spermiogenese durch interzelluläre zytoplasmatische Brücken miteinander verbunden (LIEBICH, 1999a).

Auch für den Hund beschreiben IBACH et al. (1976) und RUSSELL et al. (1990b) eine Unterteilung der Spermatogonien in die genannten Subtypen, während FOOTE et al. (1972) lediglich zwischen den Typ A- und B-Spermatogonien unterscheiden. Eine Differenzierung der caninen Spermatogonien unterbleibt hingegen bei MALONE (1918) und MINOUCHI (1928) sowie bei SANTOS et al. (2010).

Das Erscheinungsbild der caninen Typ A-Spermatogonien ist relativ heterogen (FOOTE

et al., 1972; IBACH et al., 1976). So beschreiben IBACH et al. (1976) für den Hund das Vorkommen von insgesamt 4 Generationen an Typ A-Spermatogonien. Generell ist die circa 18 μm bis 20 μm große Spermatogonie des Hundes von runder Gestalt und weist lediglich spärliche Mengen an Zytoplasma auf (SANTOS et al., 2010). Ihr mit einem Durchmesser von circa 14 μm (SANTOS et al., 2010) relativ großer, rund bis ovoid geformter Kern kann sowohl fein- als auch grob-granuläres Chromatin tragen und zeichnet sich durch eine deutliche Kernmembran aus (FOOTE et al., 1972). MALONE (1918) benennt für die ruhende canine Spermatogonie eine Anzahl von ein bis vier nukleären Kernkörperchen, welche im Falle einer Zellaktivierung zu einem einzigen großen verschmelzen können. Auch MINOUCHI (1928) und FOOTE et al. (1972) berichten von dem Vorhandensein eines einzelnen großen Nucleolus, während SANTOS et al. (2010) vom Fehlen eines prominenten Kernkörperchens sprechen.

Anders als die Typ A-Spermatogonie bildet die Typ I-Spermatogonie des Hundes lediglich eine Generation aus (IBACH et al., 1976). Diese aus mitotischer Teilung der Typ A-Spermatogonie hervorgegangene Zelle sitzt der tubulären Basalmembran abgeflacht auf, ist von geringerer Größe als die Typ A-Spermatogonie und trägt einen ovoiden Kern aus fein-granulärem Heterochromatin mit häufig mehr als einem großen Nukleolus (RUSSELL et al., 1990b).

Ebenso aus nur einer Generation besteht die canine Typ B-Spermatogonie (IBACH et al., 1976). Sie entsteht durch Mitose der Typ I-Spermatogonie und sitzt ebenfalls abgeflacht der Basalmembran des Tubulus auf (RUSSELL et al., 1990b). Kurz nach ihrer Entstehung weist die Typ B-Spermatogonie ein schnelles Wachstum bis zu einer ungefähren Größe von 7,7 μm auf (FOOTE et al., 1972). Ihr von einem dünnen Chromatinrand umgebener Kern ist kleiner als der der Typ I-Spermatogonie und trägt fein-granuläres Heterochromatin sowie durchschnittlich zwei Kernkörperchen, welche keinen Kontakt zur Kernmembran besitzen (RUSSELL et al., 1990b).

2.1.2.2.4 Spermatozyten Die Spermatozyten treten in unterschiedlichen Entwicklungsstadien sowie mit einem veränderten DNA-Gehalt in Erscheinung, sodass eine Differenzierung in primäre und sekundäre Spermatozyten erfolgt (LIEBICH, 1999a).

Bei der primären Spermatozyte des Hundes handelt es sich um eine runde, im Durchmesser circa 22 μm bis 28 μm große Zelle (SANTOS et al., 2010), welche eine Lebensdauer von 20,9 Tagen (FOOTE et al., 1972) besitzt. Sie geht aus der Typ B-Spermatogonie durch mitotische Teilung hervor und befindet sich zum Zeitpunkt ihrer Entstehung in einer präleptotänen Phase (IBACH et al., 1976; RUSSELL et al., 1990b). Im Vergleich zur Typ B-Spermatogonie weist das Erscheinungsbild der präleptotänen primären Spermatozyte des Hundes eine um 20 % bis 30 % reduzierte Größe auf (RUSSELL et al., 1990b). Ihr ebenso vergleichsweise kleiner Zellkern ist circa 6,4 μm groß (FOOTE et al., 1972) und beinhaltet neben dem granulären Heterochromatin gewöhnlich mehrere Kernkörperchen (RUSSELL et al., 1990b). Der im Bereich der Kernhülle gelegene, ausgeprägte Chromatinrand der präleptotänen primären Spermatozyte stellt das markanteste Merkmal zur Abgrenzung gegenüber der Typ B-Spermatogonie dar (RUSSELL et al., 1990b). Die präleptotäne primäre Spermatozyte tritt nach Vollendung der DNA-Replikation mit einem diploiden Chromosomensatz inklusive zwei Geschlechtschromosomen und einem doppelten DNA-Gehalt von $4n$ in die Prophase der ersten meiotischen Teilung ein (SINOWATZ, 2001). Das Erscheinungsbild der nächsten Entwicklungsstufe, der leptotänen primären Spermatozyte, ist durch das vielzählige Vorkommen sprenklig verteilter, fädiger chromosomaler Strukturen im Kern, einem prominenten Kernkörperchen sowie einer Abschwächung des nukleären Chromatinrandes gekennzeichnet (RUSSELL et al., 1990b). Im Stadium des Zygotän kommt es zur Loslösung der primären Spermatozyte von der tubulären Basalmembran sowie ihrer lumenwärtigen Verlagerung (FOOTE et al., 1972). Die geringgradig vergrößerte zygotäne Spermatozyte weist sowohl durch starke Chromatinstränge geprägte Bezirke als auch einen größeren, scheinbar Chromosomen-freien Bereich auf (RUSSELL et al., 1990b). In dem sich anschließenden Pachytän erfährt die primäre Spermatozyte ein deutliches Zell- und Kernwachstum, sodass sie schließlich die größte Zelle des Keimepithels darstellt (KERR et al., 2006). Der Kern dieser pachytänen primären Spermatozyte ist von runder Gestalt (RUSSELL et al., 1990b) und besitzt eine Größe von 10 μm (FOOTE et al., 1972). Das im Kernplasma enthaltene Chromatin ist dick-schnürig (RUSSELL et al., 1990b) und liegt in einer charakteristisch netzartigen Verteilung vor (FOOTE et al., 1972). Eine sichere Differenzierung der pachytänen vom Folgestadium der diplotänen Spermatozyten ist aufgrund fehlender histologischer Kriterien nicht möglich (RUSSELL et al.,

1990b). Während der Diakinese erfolgt eine weitere Kondensation der Chromosomen, so dass beide Chromatiden eines Chromosoms sichtbar werden (KERR et al., 2006).

Mit Abschluss der ersten meiotischen Reifeteilung liegt die sekundäre Spermatozyte vor, welche einen haploiden Chromosomensatz mit einem DNA-Gehalt von $2n$ aufweist (SINOWATZ, 2001). Die lumennah gelegene sekundäre Spermatozyte ist von kugeliger Gestalt und besitzt einen runden Zellkern (KERR et al., 2006), dessen Größe FOOTE et al. (1972) für den Hund mit circa $7,3\text{ }\mu\text{m}$ angeben. Das nukleäre Plasma ist von einer deutlichen Kernmembran umgeben und beinhaltet gleichmäßig verteiltes granuläres Chromatin (FOOTE et al., 1972) sowie zentral gelegene Kernkörperchen (KERR et al., 2006). Im Zytoplasma sind die Mitochondrien, ein prominenter Golgi-Apparat sowie das in konzentrischer Anordnung um den Kern befindliche ER vorhanden (KERR et al., 2006). Aufgrund ihrer sehr kurzen Interkinese ohne DNA-Synthese und der sich anschließenden zweiten meiotischen Teilung ist die sekundäre Spermatozyte jedoch kaum zu beobachten (LIEBICH, 1999a). Im Hinblick auf den Hund benennen FOOTE et al. (1972) ihre Lebensdauer mit 0,5 Tagen.

2.1.2.2.5 Spermatisden Aus der zweiten meiotischen Reifeteilung gehen die Spermatisden mit haploidem Chromosomensatz und einem DNA-Gehalt von $1n$ hervor (SINOWATZ, 2001). Neben der im Rahmen komplexer Differenzierungsvorgänge (Spermiogenese) stattfindenden Veränderung ihrer Gestalt, erfahren die Spermatisden eine stetige Lageveränderung im Keimepithel: so orientieren sich die anfänglich lumennah gelegenen Zellen erst Richtung Basalmembran, um schließlich nach zentripetaler Annäherung an das Tubuluslumen ihre Spermiation zu erfahren (LIEBICH, 1999a).

Beim Hund ist die junge Spermatisde von rundlicher Gestalt und besitzt eine Größe von $14\text{ }\mu\text{m}$ bis $18\text{ }\mu\text{m}$ (SANTOS et al., 2010). Ihr runder Zellkern misst $8\text{ }\mu\text{m}$ bis $10\text{ }\mu\text{m}$ (SANTOS et al., 2010) und weist einen um 30 % bis 40 % geringeren Durchmesser als die sekundären Spermatozyte auf (RUSSELL et al., 1990b). Mit Einsetzen der Golgi-Phase erfolgt die Bildung einer Vielzahl proakrosomaler Vesikel mit Granulum, welche letztlich zu einem großen akrosomalen Bläschen mit einem einzelnen Granulum verschmelzen (LIEBICH, 1999a). Dieser auch als Kappenphase bezeichnete Zeitraum der Vesikeltransforma-

tion beinhaltet zudem die Verdichtung des Chromatins, die Verlagerung des Zytoplasmas sowie die Ausbildung einer am distalen Kernpol gelegenen Implantationsgrube und endet schließlich mit der Ausbildung der „Akrosomenkappe“ (LIEBICH, 1999a). In der sich anschließenden Akrosomenphase vollendet die Akrosomenkappe ihre Wandlung in das endgültige Akrosom (LIEBICH, 1999a). In Folge einer Orientierung der Spermatiden im Keimepithel kommt der akrosomale Zellpol schließlich in Richtung tubulärer Basalmembran zum Liegen (RUSSELL et al., 1990b). Der Zellkern selbst ist sowohl in dorsoventraler Abflachung als auch in Kondensationsprozessen begriffen, dem im Bereich des distalen Kernpols gelegenen distalen Zentriol entwächst ein Geißelapparat (LIEBICH, 1999a). In der sich anschließenden Reifungsphase kommt es zum Abschluss der Kernkondensation sowie des Geißelwachstums, der Ausdifferenzierung des Flagellums und der Abschnürung des zytoplasmatischen Restkörpers (LIEBICH, 1999a).

Nach Vollendung der Spermiogenese wird die morphologisch ausgereifte Spermatide formal als Spermium beziehungsweise Spermatozoon angesprochen (LIEBICH, 1999a).

2.2 Erscheinungsbild des postnatalen (juvenilen)

Hodens

2.2.1 Descensus testis

Der beim Hund am 53. Tag post coitum (p. c.) noch nahe des kaudalen Nierenpols gelegene fetale Hoden beginnt nachfolgend den Descensus testis (BAUMANS et al., 1981). Dabei befindet sich der canine Hoden nach Beobachtungen von BAUMANS et al. (1981) zum Zeitpunkt der Geburt bereits auf halbem Weg in Richtung tiefem Inguinalring, passiert diesen bis zum Tag 5 post partum (p. p.) und beendet seinen Abstieg schließlich zwischen dem 35. und 40. Tag p. p. mit der Positionierung im Skrotum.

2.2.2 Histologisches Erscheinungsbild

Die Tubuli seminiferi des Hundes weisen von Tag 53 p. c. bis Tag 5 p. p. eine Zunahme, anschließend bis zum Tag 45 p. p. eine Verringerung ihres tubulären Durchmessers auf (BAUMANS et al., 1981). Ihr testikulärer Volumenanteil verdoppelt sich zwischen Tag 35 p. p. und dem 10. Lebensmonat (BAUMANS et al., 1981). Während FORD (1969) bei 3 Beagle-Rüden bereits im Alter von 28, 39 und 49 Tagen das Vorhandensein eines tubulären Lumens beschreibt, finden BAUMANS et al. (1981) in einer Studie an verschiedenen reinrassigen (u. a. 68 Beagle) aber auch gemischtrassigen Hunden bis zum Tag 40 p. p. lediglich massive Tubuli seminiferi. Auch MINOUCHI (1928) berichtet, dass es beim Hund erst mit Ende des 4. Monats post natum zu einer Bildung des tubulären Lumens durch Degeneration zentral gelegener Zellmassen kommt, wobei diese Entwicklung an den mit dem Rete testis in Verbindung stehenden Enden der Tubuli seminiferi beginnt.

Während der gesamten Dauer des caninen Descensus testis (Tag 53 p. c. bis Tag 40 p. p.) finden sich in den caninen Tubuli seminiferi lediglich Vorläufer der Sertolizellen sowie indifferente Keimzellen (BAUMANS et al., 1981). Letztere treten zwischen Tag 53 p. c. und der Geburt in wachsender, postnatal bis zum 45. Tag jedoch in langsam abnehmender Anzahl pro Tubulusquerschnitt auf (BAUMANS et al., 1981). Die Entwicklung der Keimzellen sowie der Grad der testikulären Reifung weisen beim Rüden rassespezifische Altersunterschiede auf (FORD, 1969). So beobachtet FORD (1969) die ersten testikulär gelegenen, ausgereiften Spermatozoen bei Collies im Alter von 11 bis 12 Monaten, wohingegen MINOUCHI (1928) diese bei gemischtrassigen Hunden bereits ab dem 8. Lebensmonat auf findet.

Die caninen Leydigzellen unterliegen zwischen dem 53. Tag p. c. und dem 30. Tag p. p. einer lediglich insignifikanten, zwischen dem Tag 35 p. p. und dem 10. Lebensmonat einer 50 %-igen Reduktion ihres prozentualen Volumenanteils (BAUMANS et al., 1981).

2.2.3 Steroidogenese

Im Zeitraum von Tag 53 p. c. bis zur Geburt (Tag 0) ist eine hohe enzymhistochemische Aktivität der 3β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase in den fetalen Leydigzellen nachweisbar, welche postnatal bis Tag 40 abnimmt und erst wieder mit Eintritt in die Pubertät ansteigt (BAUMANS et al., 1981). Die Beobachtung, dass eine Stimulation mit humanem Choriongonadotropin (hCG) am Tag der Geburt den Serumtestosteronspiegel erhöht, belegt die Fähigkeit der präpartalen/peripartalen caninen Leydigzelle zur Steroidsynthese (BAUMANS et al., 1985). BAUMANS et al. (1985) geben an, daß zwischen Tag 53 p. c. und Tag 40 p. p. die Serumtestosteronkonzentration zwischen 0,24 nmol/l und 1,45 nmol/l (entspricht 0,07 ng/ml bis 0,42 ng/ml) variiert. Entsprechend ermitteln HART und LADEWIG (1979) bei männlichen Hundewelpen im Alter von 2 bis 20 Tagen eine mittlere Testosteronkonzentration von 0,15 ng/ml. Gegenüber den im Serum gemessenen Werten liegen die intratestikulären Testosteronkonzentrationen im fetalen und im neonatalen Hoden etwa 5000-fach höher, weisen jedoch an Tag 49 p. c., Tag 0 und Tag 40 p. p. keine signifikanten Unterschiede auf (BAUMANS et al., 1985). 5α -Dihydrotestosteron (5α -DHT) konnte im caninen Hoden während des Descensus testis nicht nachgewiesen werden (BAUMANS et al., 1985).

2.3 Ablauf der Spermatogenese

2.3.1 Stadien der Spermatogenese

Der Begriff Spermatogenese umfasst alle der Vermehrung und Differenzierung männlicher Keimzellen zugrunde liegenden Abläufe (LIEBICH, 1999a). In seiner Übersicht teilt LIEBICH (1999a) die Spermatogenese in die Stadien der Spermatozytogenese sowie der nachfolgenden Spermiogenese ein. Andere Autoren, wie HILSCHER und HILSCHER (1969), HOFFMANN (2003) oder HOLSTEIN et al. (2003), hingegen sprechen zusätzlich von der Spermatogoniogenese als initiales Stadium der Vermehrungsphase.

2.3.1.1 Spermatogoniogenese

Unter der Spermatogoniogenese ist die Vermehrungsphase der Spermatogonien durch mitotische Teilung zu verstehen, wobei die Zellen entweder der kontinuierlichen Erneuerung ihres „Stammzellen-Reservoirs“ dienen oder eine Differenzierung erfahren (HILSCHER und HILSCHER, 1969). Mit dem Erreichen des Entwicklungsstadiums der Typ B-Spermatogonie endet die Spermatogoniogenese (IBACH et al., 1976). Eine detaillierte morphologische Beschreibung der im Rahmen dieser Phase vorliegenden Typ A-, I- und B-Spermatogonien findet sich in Kapitel 2.1.2.2.3.

2.3.1.2 Spermatozytogenese

Die Spermatozytogenese stellt die zweite Phase der Keimzellvermehrung dar und umfasst den Zeitraum zwischen dem Abschluss der Spermatogoniogenese und der Vollendung der Meiose (HILSCHER und HILSCHER, 1969). Kapitel 2.1.2.2.4 gibt unter besonderer Berücksichtigung der meiotischen Reifungsteilung einen Überblick über die in diesem Stadium vorkommenden primären und sekundären Spermatozyten.

2.3.1.3 Spermiogenese

Unter der Spermiogenese ist die in Golgi-, Kappen-, Akrosomen- und Reifungsphase gegliederte Transformationsphase der Spermatiden zu verstehen, in deren Verlauf sich die anfänglich runden Spermatiden zu den morphologisch ausgereiften Spermien entwickeln (LEBLOND und CLERMONT, 1952). Eine Übersicht über die verschiedenen Entwicklungsstadien der Spermatiden gibt Kapitel 2.1.2.2.5.

2.3.2 Spermatogenesezyklus

Der Spermatogenesezyklus umfasst den Zeitraum vom Einsetzen der mitotischen Teilungsaktivität der Spermatogonien bis zur Spermiation der ausgereiften Spermatiden (SINOWATZ, 2001). Allgemein werden für den Vorgang der Spermatogenese 4,5 Keim-epithelzyklen benötigt (RUSSELL et al., 1990a). Auch GÜNZEL-APEL (1994) benennt für die Bildung der caninen Samenzellen eine Anzahl von 4 bis 5 Tubulusepithelzyklen sowie eine Zeitspanne von 8 bis 9 Wochen. Entsprechend geben SOARES et al. (2009) die Dauer

des caninen Spermatogenesezyklus ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) mit $61,9 \pm 0,14$ Tagen (Beagle, Labrador, Pinscher, Pudel und Mischlinge) bzw. $56,5 \pm 1,17$ Tagen (American Pitbull) an.

2.3.3 Keimepithelzyklus

Unter dem Keimepithelzyklus ist das einmalige Durchlaufen sämtlicher, in morphologischer und chronologischer Abfolge auftretenden Keimzellbilder (Stages) in einem bestimmten Segment des Keimepithels zu verstehen (RUSSELL et al., 1990a). Während IBACH et al. (1976) die Anzahl dieser Stages für den Hund mit 10 benennen, unterscheiden FOOTE et al. (1972), RUSSELL et al. (1990b) und SOARES et al. (2009) lediglich 8 Keimzellbilder. Die Dauer des caninen Keimepithelzyklus geben FOOTE et al. (1972) mit $13,6 \pm 0,7$ Tagen ($\bar{x} \pm \text{SE}$) an. Dies entspricht der für die Rassen Beagle, Labrador, Pinscher und Pudel sowie die gemischtrassigen Hunde in einer späteren Studie ermittelten mittleren Länge des Keimepithelzyklus von $13,73 \pm 0,03$ Tagen ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) (SOARES et al., 2009). Entsprechend des bereits von CLERMONT (1972) innerhalb einer Spezies analysierten Vorliegens rassespezifischen Unterschiede, stellen SOARES et al. (2009) für den American Pitbull eine signifikante Verkürzung des Keimepithelzyklus auf $12,55 \pm 0,26$ Tage ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) fest.

2.3.4 Staging der Spermatogenese des Hundes

Die Stages I bis VIII des caninen Keimepithelzyklus werden von RUSSELL et al. (1990b) anhand der nachfolgend beschriebenen, maßgeblich auf der morphologischen Entwicklung der jungen Spermatide basierenden Kriterien determiniert:

Stage I: Das Stage I ist durch das Erscheinen der jüngsten Generation runder Spermatiden, in welchen lichtmikroskopisch noch keine proakrosomalen Vesikel und Granula nachweisbar sind, gekennzeichnet.

Stage II: Innerhalb des Stage II erfolgt die Ausbildung und Verschmelzung der proakrosomalen Vesikel und Granula zu einem großen akrosomalen Vesikel mit einem einzelmembranumgebenen Granulum. In der Folge tritt das Vesikel nun mit dem Kern der Spermatide in Kontakt und bewirkt dabei dessen Einbuchtung.

Stage III: Im Stage III positioniert sich das bislang zufällig im Vesikel gelegene akro-

somale Granulum an der Oberfläche des Spermatidenzellkerns.

Stage IV: Während des Stage IV erfährt das runde akrosomale Vesikel eine unvollständige Abflachung über dem Nukleus.

Stage V: Im Stage V weist der Spermatidenkern, infolge des vorhergehenden vollständigen Kollapses des akrosomalen Vesikels, wieder ein rundes Erscheinungsbild auf.

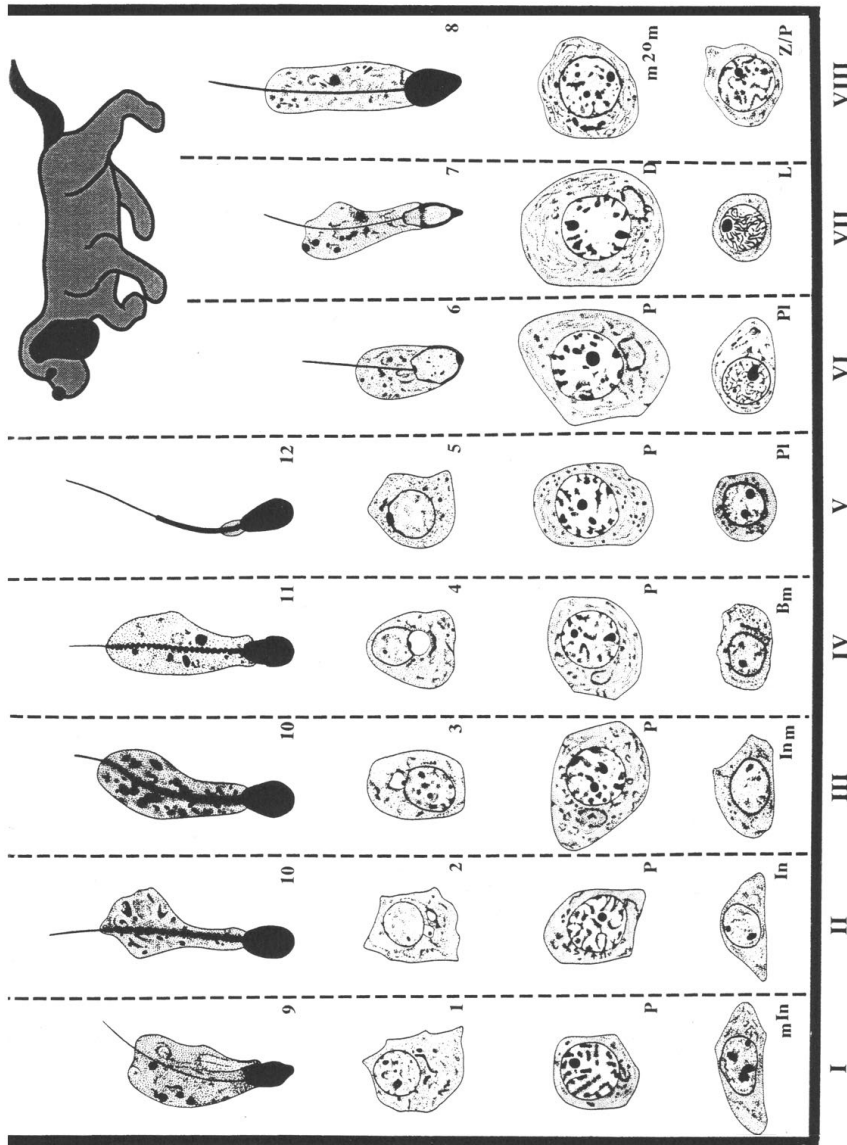
Stage VI: Im Verlauf des Stage VI gibt der Nukleus seine zentrale Lage auf und tritt über das Akrosom in Kontakt mit der Zellmembran. Das Akrosom kommt schließlich in Richtung Sertolizellkörper zum Liegen. Es setzt die bilaterale Abflachung des Spermatidenkerns ein.

Stage VII: Das Stage VII ist durch den Abschluss der bereits in Stage VI begonnenen Elongation des Spermatidenkerns gekennzeichnet.

Stage VIII: Das Stage VIII schließlich ist durch das Vorliegen sekundärer Spermatozyten bzw. deren vorausgehender oder nachfolgender meiotischer Figuren charakterisiert.

Die Spermiation der elongierten Spermatiden erfolgt vornehmlich gegen Ende des Stage IV, spätestens jedoch mit dem beginnenden Stage V.

Einen Überblick der Stadien des caninen Keimepithelzyklus nach RUSSELL et al. (1990b) zeigt Abbildung 2.1 (Reprinted with permission of Cache River Science, an imprint of Quick Publishing, LC, phone 314-432-3435, fax 314-993-4485, Email Cacheriverpress@sbcglobal.net.).



STAGES OF THE CYCLE

Abbildung 2.1: Stadien des caninen Keimepithelzyklus nach RUSSELL et al. (1990b)

(Reprinted with permission of Cache River Science, an imprint of Quick Publishing, LC, phone 314-432-3435, fax 314-993-4485, Email Cacheriverpress@sbcglobal.net.)

2.4 Neuroendokrine Regulation der Hodenfunktion

2.4.1 Gonadotropin Releasing Hormone

Das Dekapeptid Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH, Gonadoliberin) wird im rostralen und mediobasalen Hypothalamus synthetisiert und im Neurohämälorgan Eminentia mediana gespeichert (DÖCKE, 1994c). Seine pulsatile Sekretion in das hypophysäre Portalgefäßsystem (CARMEL et al., 1976) unterliegt der Steuerung des im mediobasalen Hypothalamus („hypophysiotrophic area“, HALÁSZ und PUPP, 1965) gelegenen Pulsgenerators (MAEDA et al., 1995), dessen episodische Aktivität ursächlich bislang nicht sicher identifiziert ist (MAEDA et al., 2010). Über die Bindung spezifischer, in der Plasmamembran hypophysärer Zellen lokalisierter Rezeptoren (ZOLMAN und VALENTA, 1980) übt GnRH einen regulierenden Einfluss auf die Bildung (REDDING et al., 1972) und die Freisetzung (SCHALLY et al., 1971; REDDING et al., 1972) der Gonadotropine FSH und LH aus. Sowohl für die Transkription gonadotroper Gene (DALKIN et al., 1989; HAISENLEDER et al., 1991; KAISER et al., 1997) als auch die Expression der GnRH-Rezeptoren (KATT et al., 1985; KAISER et al., 1997) ist dabei die Pulsatilität der GnRH-Sekretion von entscheidender Bedeutung. Eine von der physiologisch schwankenden GnRH-Konzentration abweichende, gleichbleibend hohe Konzentration an GnRH bedingt eine aus der quantitativen Down-Regulation der GnRH-Rezeptoren resultierende hypophysäre Desensibilisierung (CLAYTON, 1982).

Für den Rüden war nach einmaliger Applikation von exogenem GnRH eine deutliche Erhöhung der Plasmakonzentrationen an LH und in der Folge an Testosteron, nicht aber an Estradiol-17 β feststellbar (JONES et al., 1976). Obwohl auch nach wiederholten GnRH-Gaben eine Zunahme des LH im Plasma des Hundes erfolgt, ist doch eine abnehmende Reaktivität der gonadotropen Zellen zu beobachten (JONES et al., 1976). Eine nach kurzzeitiger, initialer Stimulation einsetzende Suppression der caninen Gonadotropin- und Steroidhormonfreisetzung ist als Folge diverser chronisch applizierter GnRH-Agonisten beschrieben (FONTAINE und FONTBONNE, 2011).

Im Rahmen der Hypothalamus-Hypophysen-Hoden-Achse unterliegt die Steuerung der GnRH-Sekretion einem Regelkreis (DÖCKE, 1994b,c):

Dabei übt nicht nur das GnRH selbst über ein „ultra kurzes“ Feedback eine hemmende Wirkung auf seine Freisetzung aus, sondern auch sämtliche in seiner Folge sezernierten Hormone. So wirken die Gonadotropine FSH und LH über ein „kurzes“ Feedback, die Steroidhormone Testosteron und Östrogene über ein „langes“ Feedback negativ rückkoppelnd auf die Sekretion des GnRH ein.

Für den Rüden erbringen JONES und BOYNS (1976) den Nachweis einer Estradiol-induzierten Reduktion der hypophysären Ansprechbarkeit auf GnRH sowie nachfolgender Abnahme der basalen LH-Konzentration. Entsprechend konnten PETERS et al. (2000) eine negative Korrelation zwischen der Estradiol- und LH-Konzentration im peripheren venösen Blut beim Rüden feststellen.

2.4.2 Gonadotropine

Bei den in der Adenohypophyse synthetisierten Gonadotropinen Luteinisierendes Hormon (LH, Lutropin) und Follikelstimulierendes Hormon (FSH, Folitropin) handelt es sich um komplexe Glykoproteine, deren Hormonspezifität sich aus der β -Untereinheit ihres dimeren Proteinanteils ableitet (DÖCKE, 1994c).

2.4.2.1 Luteinisierendes Hormon

Entsprechend der GnRH-Sekretion erfolgt die Freisetzung von LH pulsatil (BELCHETZ, 1983), wie auch für den Rüden gezeigt werden konnte (GÜNZEL-APEL et al., 1994; KOCH et al., 2006). Intakte adulte Rüden weisen unter Lichteinfluss im Mittel alle $103,4 \pm 14,2$ Minuten ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) sowie in Dunkelheit alle $86,9 \pm 8,2$ Minuten ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) ein LH-Maximum auf, wobei eine diurnale Rhythmik der LH-Freisetzung nicht erkennbar ist (DEPALATIS et al., 1978). Die im peripheren Blutplasma intakter Mischlingsrüden gemessenen LH-Konzentrationen bewegen sich zwischen 0,2 und 12,0 ng/ml (DEPALATIS et al., 1978). GÜNZEL-APEL et al. (1994) geben Werte von 0,0 bis 27,2 ng/ml an. Für die mittleren LH-Konzentrationen finden sich in der Literatur folgende Werte: $4,6 \pm 0,5 \mu\text{g/l}$ (entspricht $4,6 \pm 0,5 \text{ ng/ml}$; $\bar{x} \pm \text{SEM}$; KNOL et al., 1993), $4,6 \pm 1,3 \text{ ng/ml}$ ($\bar{x} \pm \text{SD}$; KOCH et al., 2006) bzw. $4,6 \pm 2,7 \text{ ng/ml}$ ($\bar{x} \pm \text{SD}$; URHAUSEN et al., 2009) bei maturen Beagle-

Rüden sowie $8,2 \pm 4,7$ ng/ml ($\bar{x} \pm \text{SD}$) bei männlichen Fox Terriern (URHAUSEN et al., 2009) und $5,0 \pm 0,5$ ng/ml ($\bar{x} \pm \text{SE}$) bei Rüden unterschiedlicher Rassen (PETERS et al., 2000). Eine signifikante Korrelation zwischen dem Alter der Tiere und der peripheren mittleren LH-Konzentration schließen PETERS et al. (2000) aus.

Der stimulierende Einfluss von LH auf die testikuläre Testosteronsynthese wird durch die den Leydigzellen eigenen LH-Rezeptoren vermittelt (HUHTANIEMI und TOPPARI, 1995).

2.4.2.2 Follikelstimulierendes Hormon

Für den Rüden wird die mittlere Plasmakonzentration des Follikelstimulierenden Hormons (FSH) mit $5,0 \pm 0,5$ ng/ml ($\bar{x} \pm \text{S.E.}$) angegeben (PETERS et al., 2000). Diese weist eine signifikant positive Korrelation mit den im Plasma bestimmten Konzentrationen an LH, Testosteron und Estradiol auf (PETERS et al., 2000).

Den Nachweis eines testikulären spezifischen FSH-Rezeptors (FSH-R) erbringen SEGRETAIN et al. (2010) sowohl bei der maturen als auch der immaturen Ratte in den Sertolizellen, den Spermatogonien sowie den frühen Spermatozyten. Die Expression der entsprechenden FSH-R mRNA unterliegt bei der immaturen Ratte in vivo wie in vitro einer FSH-induzierten Regulation (MAGUIRE et al., 1997) und erfährt bei der maturen Ratte eine stagespezifische Ausprägung (KLIESCH et al., 1992; RANNIKKO et al., 1996).

Funktionell übt FSH auf die immature Ratte in Abhängigkeit des Alters einen die Proliferation der Sertolizellen stimulierenden bzw. einen die Apoptose der Keimzellen minimierenden Einfluss aus (MEACHEM et al., 2005). Einen über die Regulation des intrinsischen Apoptoseweges vermittelten positiven Effekt auf das Überleben der Spermatogonien belegen RUWANPURA et al. (2008) auch bei der maturen Ratte. Desweiteren scheint FSH bei der immaturen Ratte über eine Steigerung sowohl der Androgen-Rezeptor (AR) mRNA als auch deren Protein die Ansprechbarkeit der Sertolizellen gegenüber Testosteron zu regulieren (BLOK et al., 1989). Auch ein Testosteron-unabhängiger Effekt des FSH auf die in der Sertolizelle erfolgende Synthese und Sekretion des Androgen-binding Protein (ABP) ist für die immaturen Ratte beschrieben (LOUIS und FRITZ, 1979).

2.5 Testikuläre Hormonsynthese bei spezieller Berücksichtigung der Situation beim Rüden

2.5.1 Steroidhormone

2.5.1.1 Testosteron

Testosteron ist das Hauptprodukt der caninen testikulären Steroidhormonsekretion (WASSERMANN und EIK-NES, 1969). Im Hoden erfolgt seine Synthese in den Leydigzellen (STOCCO, 1998), deren Ultrastruktur beim Hund einen Einfluss auf die speziesspezifische Sekretionsmenge dieses Hormones besitzt (ZIRKIN et al., 1980). So beschreiben ZIRKIN et al. (1980) nach in vitro Stimulation mit ovinem LH am perfundierten Hoden eine hochsignifikant positive Korrelation zwischen der mittleren Volumendichte des glatten ER und der Sekretion von Testosteron. Die in Folge dieser Stimulation synthetisierte Mengen an Testosteron benennen EWING et al. (1979) bzw. ZIRKIN et al. (1980) beim Hund mit $116,4 \pm 14,8$ bzw. $113,5 \pm 20,5$ μg Testosteron pro g Leydigzelle und Stunde ($\bar{x} \pm \text{SEM}$ bzw. SE).

Bereits EIK-NES und KEKRE (1963) berichten, dass beim Hund die Bildung von Testosteron aus Cholesterol offensichtlich bevorzugt über den Δ^5 -Metaboliten 17α -Hydroxypregnenolon erfolgt. Auch TREMBLAY und BELANGER (1985) erbringen nach Stimulation mit einem LHRH-Analogen den Nachweis eines Anstieges der Δ^5 -Steroide und bestätigen so die Bedeutung des Δ^5 -Syntheseweges für die canine testikuläre Steroidogenese.

Die Freisetzung des Testosterons erfolgt episodisch (BOULANGER et al., 1982; THUN et al., 1990), wobei bislang weder eine diurnale (DEPALATIS et al., 1978) noch eine circadiane (BOULANGER et al., 1982; THUN et al., 1990) Rhythmik nachgewiesen ist. Im Tagesverlauf unterliegen die im peripheren Blutplasma bestimmten Messwerte großen Schwankungen (BOULANGER et al., 1982). Die Testosteronkonzentrationen bewegen sich zwischen 0,4-6,0 ng/ml (DEPALATIS et al., 1978), 0,7-23,0 nmol/l (entspricht 0,2-6,6 ng/ml) (SUNDBY und ULSTEIN, 1981) und 3,7-21,8 nmol/l (entspricht 1,1-6,3 ng/ml) (THUN et al., 1990). Die Variation der mittleren Testosteronkonzentration benennen SUNDBY und ULSTEIN, 1981 mit 26-62 %.

2.5. Testikuläre Hormonsynthese bei spezieller Berücksichtigung d. Situation b. Rüden

Tabelle 2.1 bietet eine Übersicht über die in der jüngeren Literatur publizierten Werte der peripheren Testosteronkonzentrationen bei Rüden.

Tabelle 2.1: Testosteronkonzentration (ng/ml) im venösen peripheren Blutplasma adulter Rüden [Mittelwert (\bar{x} , $\bar{x} \pm SD$ ¹, $\bar{x} \pm SE$ bzw. SEM² oder $\bar{x}_{geom.}$ (SF)); Bereich (min. - max.)]

	ng/ml	
	Mittelwert	Bereich
LUDWIG et al., 2009	1,2 (2,8)	0,7 - 2,1
KAWAKAMI et al., 2007	$2,34 \pm 0,20$ ²	
KOCH et al., 2006	$2,5 \pm 0,9$ ¹	1,5 - 3,8
ORTEGA-PACHECO et al., 2006	$2,0 \pm 1,6$ ^{c,1}	
KAWAKAMI et al., 2004	$2,05 \pm 0,34$ ²	
MISCHKE et al., 2002		0,05 - 3,70
PETERS et al., 2000	$3,7 \pm 0,4$ ^{c,2}	
RIESENBECK et al., 1999	1,93 (2,95) / 2,80 (2,17)	
RÖCKEN et al., 1995		0,24 - 6,02
KNOL et al., 1993	$2,8 \pm 0,5$ ^{c,2}	
THUN et al., 1990		1,1 - 6,3 ^c
TREMBLAY und BELANGER, 1985	$2,4 \pm 0,35$ ²	
TREMBLAY et al., 1984	$2,617 \pm 0,382$ ^a	
SUNDBY und ULSTEIN, 1981		0,2 - 6,6 ^c
DEPALATIS et al., 1978		0,4 - 6,2
LLOYD et al., 1975	$0,472 \pm 0,023$ ^{b,2}	
COMHAIRE et al., 1974	$0,82$ ^b	0,215 - 2,13
TREMBLAY et al., 1972	$1,15 \pm 0,46$ ^{b,1}	
WASSERMANN und EIK-NES, 1969	$0,2$ ^b	

zur besseren Vergleichbarkeit erfolgt die Darstellung aller Werte in ng/ml

[Umrechnung: ^a pg/ml in ng/ml; ^b ng/100ml in ng/ml; ^c nmol/l in ng/ml (Divisor 3,467)]

Von einer saisonalen Beeinflussung der Testosteronkonzentration gehen FALVO et al. (1980) aus, die im Blutplasma von Hunden eine signifikante Erhöhung der über das Jahr relativ

niedrigen Testosteronkonzentration gegen Ende August/Anfang September feststellten und dies als mögliches Relikt einer evolutionär bedingten Paarungszeit der Carnivoren interpretieren. TAHA et al. (1981) sowie THUN et al. (1990) verneinen jedoch jeglichen saisonalen Einfluss auf die Testosteronsekretion. Einen von BRENDLER et al. (1983) für adulte Hunde beschriebenen negativen Einfluss des zunehmenden Alters auf die Testosteronkonzentration im peripheren Blutplasma können weder TAHA und NOAKES (1982) noch GÜNZEL-APEL et al. (1990), LOWSETH et al. (1990) oder PETERS et al. (2000) bestätigen.

2.5.1.2 Östrogene

Die Bildung der Östrogene ist an das mikrosomale Enzym Aromatase Cytochrom P450 gebunden (SIMPSON et al., 2002). Im Hoden ist die Expression dieses Enzyms sowohl in den präpubertären (KUROSUMI et al., 1985; BILIŃSKA et al., 2000; HESS und ROSER, 2004; MUTEMBEI et al., 2005) als auch den adulten (KUROSUMI et al., 1985; BRODIE und INKSTER, 1993; NITTA et al., 1993; TSUBOTA et al., 1993; INKSTER et al., 1995; LEVALLET et al., 1998; BILIŃSKA et al., 2000; CARPINO et al., 2001; HESS und ROSER, 2004; MUTEMBEI et al., 2005; ZHANG et al., 2010) Leydigzellen nachgewiesen. Entsprechendes gilt für die fetalen (BONAGURA et al., 2011), immaturen (CARPINO et al., 2001) und maturen (BILIŃSKA et al., 2000; ZHANG et al., 2010) Sertolizellen. Aromatase-positive Reaktionen zeigten sich ebenfalls in den Keimzellen, so den Spermatogonien (ZHANG et al., 2010), den Spermatozyten (NITTA et al., 1993; BILIŃSKA et al., 2000; CARPINO et al., 2001), den runden (NITTA et al., 1993; TSUBOTA et al., 1993; CARPINO et al., 2001; ZHANG et al., 2010), den elongierenden (NITTA et al., 1993; TSUBOTA et al., 1993) und den elongierten (NITTA et al., 1993; LEVALLET et al., 1998; CARPINO et al., 2001) Spermatiden.

Das die höchste biologische Wirksamkeit entfaltende endogene Östrogen ist 17β -Estradiol (BAMBERG, 1994). Obwohl auch für den Rüden die testikuläre Synthese von 17β -Estradiol nachgewiesen ist (KELCH et al., 1972), existieren keine Untersuchungen, welche sich mit der sicheren Identifikation 17β -Estradiol-sekretierender Zellen im gesunden caninen Hoden befassen (KAWAKAMI et al., 2004). Bei Hunden mit Sertolizelltumoren als auch bei

2.5. Testikuläre Hormonsynthese bei spezieller Berücksichtigung d. Situation b. Rüden

einem Teil der Rüden mit Leydigzelltumoren war jedoch eine erhöhte periphere 17β -Estradiolkonzentration nachweisbar (RIESENBECK et al., 1999). Einen signifikanten peripheren Anstieg dieses Hormons beschreiben PETERS et al. (2000), KAWAKAMI et al. (2001) sowie MISCHKE et al. (2002) bei an Sertolizelltumoren erkrankten Rüden, PETERS et al. (2000) beim Vorliegen caniner Leydigzelltumoren. Die an einem Seminom leidenden Rüden wiesen zum Teil unveränderte (PETERS et al., 2000), zum Teil erhöhte (COMHAIRE et al., 1974) oder signifikant erniedrigte (MISCHKE et al., 2002) periphere Estradiol- 17β -Konzentrationen auf.

Einen Überblick über die im peripheren Blutplasma gesunder Rüden gemessenen 17β -Estradiolkonzentrationen gibt Tabelle 2.2.

Tabelle 2.2: 17β -Estradiolkonzentration (pg/ml) im venösen peripheren Blutplasma adulter Rüden [Mittelwert (\bar{x} , $\bar{x} \pm \text{SE}$ bzw. SEM oder $\bar{x}_{geom.}$ (SF)); Bereich (min. - max.)]

	pg/ml	
	Mittelwert	Bereich
LUDWIG et al., 2009	7,4 (1,7)	2 - 20,3
MISCHKE et al., 2002		8,6 - 31,5
PETERS et al., 2000	$3,45 \pm 0,46^b$	
RIESENBECK et al., 1999	12,38 (1,77) / 11,48 (1,77)	
LLOYD et al., 1975	31 ± 16^a	
COMHAIRE et al., 1974	16^a	9,5 - 24 ^a

zur besseren Vergleichbarkeit erfolgt die Darstellung aller Werte in pg/ml
[Umrechnung: ^a ng/100ml in pg/ml; ^b pmol/l in pg/ml (Multiplikator 0,272)]

Mit 7,4 ng/100ml (entspricht 74 pg/ml) bzw. 298 ± 26 pmol/l (entspricht $81,1 \pm 7,1$ pg/ml) messen COMHAIRE et al. (1974) sowie PETERS et al. (2000) in der Vena testicularis eine deutlich höhere 17β -Estradiolkonzentrationen als im peripheren Blut. Ein mit zunehmendem Alter messbarer Abfall der 17β -Estradiolkonzentrationen war lediglich im testikulären (PETERS et al., 2000), nicht aber im peripheren Blut (BRENDLER et al., 1983, PETERS

et al., 2000) feststellbar.

Innerhalb des Regelkreises der Hypothalamus-Hypophysen-Hoden-Achse wird den Östrogenen ein allgemein hemmender Effekt auf die Freisetzung der Gonadotropine zugeschrieben (SHUPNIK und SCHREIHOFFER, 1997). So beobachten WINTER et al. (1982) nach Applikation von 17β -Estradiol eine signifikante Abnahme der FSH- und LH-Konzentrationen im peripheren Blutplasma kastrierter Rüden.

2.5.2 Sonstige hormonelle Wirkstoffe testikulären Ursprungs

2.5.2.1 Inhibin und Aktivin

Hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Reproduktion gehören Inhibin und Aktivin zu den meist untersuchten Mitgliedern der Transforming Growth Factor β (TGF β)- Superfamilie (BARAKAT et al., 2012).

Die Bezeichnung „Inhibin“ fand erstmals Anwendung auf ein wasserlösliches testikuläres Hormon, welches eine hemmende Eigenschaft auf die übermäßige hypophysäre Gonadotropin-Freisetzung post castrationem zeigte (McCULLAGH, 1932).

Bei Inhibin handelt es sich um ein dimeres Glykoprotein, welches aus einer über Disulfidbrücken verbundenen α - und β -Untereinheit besteht (BURGER, 1988; DE KRETZER und ROBERTSON, 1989). Aufgrund des Vorkommens verschiedener Formen der β -Untereinheit ist eine strukturelle Unterscheidung in Inhibin A (α - β_A) und B (α - β_B) möglich (DE KRETZER et al., 2002; BARAKAT et al., 2012). Die testikuläre Synthese bzw. Sekretion des Inhibins unterliegt der Stimulation durch FSH (LE GAC und DE KRETZER, 1982; AU et al., 1986; McLACHLAN et al., 1988a; McLACHLAN et al., 1988b; MORRIS et al., 1988), beim Mann zudem auch der durch LH (McLACHLAN et al., 1988a; McLACHLAN et al., 1988b). Die Synthese des Inhibins ist vornehmlich in den Sertolizellen lokalisiert (DÖCKE, 1994c). Bei der adulten Ratte konnte die Inhibin- α -Untereinheit mittels immunhistochemischer Detektion sowohl in den Sertoli- als auch den Leydigzellen nachgewiesen werden (MAJDIC et al., 1997). Die Bildung von Inhibin durch die Leydigzelle adulter Ratten ist in vitro zwar beschrieben (MADDOCKS und SHARPE, 1989; RISBRIDGER et al., 1989), ein

bedeutender Einfluss dieses Zelltyps auf die Inhibinkonzentration war im testikulären und peripheren Blutplasma jedoch nicht nachweisbar (MADDOCKS und SHARPE, 1989).

Die Freisetzung des Inhibins ins Blutgefäßsystem erfolgt episodisch (DÖCKE, 1994c). Das zirkulierende Inhibin des männlichen Organismus ist das Inhibin B (ANAWALT et al., 1996; ILLINGWORTH et al., 1996; WOODRUFF et al., 1996). Es besitzt eine negativ rückkoppelnde Wirkung auf die hypophysäre FSH-Synthese (WEISS et al., 1993) und -Sekretion (RIVIER et al., 1991; HAYES et al., 2001; BOEPPLE et al., 2008). Unter zeitgleichem Einwirken von Luteinisierendem Hormon (LH) übt Inhibin zudem einen lokal fördernden Einfluss auf die gonadale Androgensynthese aus (HSUEH et al., 1987). Inhibin B ist als endokriner Marker der Spermatogenese von diagnostischer Bedeutung (PIERIK et al., 1998; VON ECKARDSTEIN et al., 1999; HIPLER et al., 2001).

Funktioneller Antagonist des Inhibins ist das die Synthese und Freisetzung des hypophysären FSH stimulierende Aktivin (WEISS et al., 1993). Bei Aktivin, welches aus zwei über Disulfidbrücken verbundenen β -Untereinheiten besteht, wird zwischen Aktivin A (β_A - β_A), Aktivin AB (β_A - β_B) und Aktivin B (β_B - β_B) unterschieden (DE KRETZER et al., 2002; BARAKAT et al., 2012). Intratestikulär ist ein proliferationsfördernder Effekt des Aktivin A auf die Sertolizellen (BUZZARD et al., 2003; NICHOLLS et al., 2012) sowie des Aktivin A und B auf die Spermatogonien (MATHER et al., 1990) immaturer Ratten beschrieben. Das Vorkommen der Aktivin β_A - und/oder Aktivin β_B -mRNA-Untereinheiten ist in einer Vielzahl an Geweben, inklusive dem Hoden und der Hypophyse, beschrieben (MEUNIER et al., 1988; SCHNEIDER et al., 2000). Auch der Nachweis der das Aktivin bildenden Peptid-Untereinheiten β_A und/oder β_B gelingt sowohl in der Hypophyse (ROBERTS et al., 1989b; UCCELLA et al., 2000) als auch im Hoden (ROBERTS et al., 1989a; MAJDIC et al., 1997). Das Vorliegen der die Aktivinrezeptoren Subtypen II (ActRII) und IIB (ActRIIB) codierenden mRNA konnte bei der Ratte sowohl in der Hypophyse (CAMERON et al., 1994) als auch dem Hoden (FENG et al., 1993; CAMERON et al., 1994) gezeigt werden. Intratestikulär lokalisieren CAMERON et al. (1994) bei adulten Ratten die ActRII-mRNA in den pachytänen Spermatozyten und runden Spermatiden, die ActRIIB-mRNA hingegen in den Leydigzellen. Ein auto- (CORRIGAN et al., 1991; UCCELLA et al., 2000) bzw. parakriner (HSUEH et al., 1987; UCCELLA et al., 2000) Einfluss der Aktivine auf Ebene

der Hypophyse (CORRIGAN et al., 1991; UCCELLA et al., 2000) als auch der männlichen Gonaden (HSUEH et al., 1987) wird angenommen.

Während GARDE et al. (1989) beim Hund das Inhibin in den Leydigzellen sowie den Sertolizellen, Spermatogonien und primären Spermatozyten nachweisen konnten, detektierten TANIYAMA et al. (2001) beim adulten Rüden die Inhibin- und Aktivin-bildenden Untereinheiten α , β_A und β_B lediglich in den Leydigzellen. Auch MARINO und ZANGHI (2013) verneinen das Vorhandensein von Inhibin-Untereinheiten in den Sertolizellen adulter Hunde. BANCO et al. (2010) wiederum, welche Hunde unterschiedlichen Alters untersuchten, beschreiben das Vorkommen von Inhibin- α nicht nur in den Leydigzellen eines 6 Monate alten Welpens sowie adulter Rüden, sondern auch in den Sertolizellen von Neonaten. Vergleichbare Ergebnisse liefern auch GRIECO et al. (2011), welche beim Rüden eine Änderung der zellulären Lokalisation der Inhibin- α -Expression im Verlauf der testikulären Reifung vermuten. Die Leydigzelle stellt schließlich die primäre Quelle des Inhibins dar (TANIYAMA et al., 2001; GRIECO et al., 2011).

Die Inhibin-like Immunoreactivity im testikulären und peripheren venösen Blutplasma adulter Rüden beträgt im Mittel 261 ± 32 U/ml bzw. $17,5 \pm 1,5$ U/ml (PETERS et al., 2000).

2.5.2.2 Relaxin

Relaxin ist ein Peptidhormon (HOFFMANN, 1994), welches im männlichen Reproduktionstrakt von Mensch (ESSIG et al., 1982) und Säugetier (AGOULNIK, 2007) vornehmlich in der Prostata synthetisiert wird. Während im menschlichen Hoden das Protein nicht nachgewiesen wurde (YKI-JÄRVINEN et al., 1983), gelang die intratestikuläre Lokalisation eines Vorläuferproteins des Relaxins sowohl in den Leydigzellen des immaturren und matten Ebers (KATO et al., 2010), als auch in den Sertolizellen immaturren Ratten sowie den Sertolizellen, den pachytären Spermatozyten und den Spermatiden matten Ratten (CARDOSO et al., 2010). Den Relaxin-like family peptide receptor 1 (Rxfp1), auch Leucine-rich Repeat-containing G protein-coupled Receptor 7 (LGR7) genannt, lokalisieren KOHSAKA et al. (2009) und KATO et al. (2010) beim Eber in den Leydigzellen sowie

den Zellen des Keimepithels, bei der Ratte wiesen ihn FILONZI et al. (2007) in den späten Keimzellstadien und „diffus“ im basalen Kompartiment der Tubuli seminiferi sowie in kultivierten Sertolizellen nach. Aufgrund des testikulären Vorkommens des Relaxin-Vorläuferproteins sowie des Relaxin-Rezeptors nehmen CARDOSO et al. (2010) bei der Ratte das Vorliegen intratestikulärer autokriner oder parakriner Regulationsmechanismen sowie einen direkten oder indirekten Einfluss des Peptids auf die Spermatogenese an.

Während das canine Seminalplasma eine Relaxinkonzentration von 228 ± 223 ng/ml ($\bar{x} \pm SD$) aufweist (STEINETZ et al., 1996), scheiterte ein Nachweis dieses Peptidhormons im Blut von Rüden (STEINETZ et al., 1987; STEINETZ et al., 1996).

2.5.2.3 Relaxin-like Faktor (RLF)/Insulin-like Peptide 3 (INSL3)

Nachdem ADHAM et al. (1993) in den Leydigzellen des Ebers ein der Insulin-IGF-Relaxin-Familie zugehöriges „Leydig insulin-like“ (Ley-I-L) Peptid isoliert hatten, identifizieren BÜLLESBACH und SCHWABE (1995) beim Menschen das Ley-I-L Peptid als Relaxin-like factor (RLF). Der RLF, in jüngerer Literatur auch Insulin-like Peptide 3 (INSL3) genannt, stellt ein Hauptprodukt der Leydigzelle dar (ANAND-IVELL et al., 2009). Seine testikuläre Expression auf Proteinebene wurde erstmals durch IVELL et al. (1997) bestätigt. Der RLF vermittelt seine Funktion als spezifischer Ligand über den Leucine-rich Repeat-containing G Protein-coupled Receptor 8 (LGR8) (KUMAGAI et al., 2002; BOGATCHEVA et al., 2003).

Beim Rüden wurde der/das RLF/INSL3 in den fetalen (ARRIGHI et al., 2009) und postpubertären (KLONISCH et al., 2001; ARRIGHI et al., 2009) Leydigzellen nachgewiesen. Das entsprechende LGR8-Protein fanden ARRIGHI et al. (2009) im fetalen Hodengewebe des Hundes in selbigem Zelltyp. Für den fertilen Mann gelang der Nachweis dieses Rezeptorproteins nicht nur in den Leydigzellen, sondern auch den runden Spermatozyten (ANAND-IVELL et al., 2006).

Neben einer möglichen funktionellen Bedeutung als Mechanismus zur autokrinen Selbstregulation der Leydigzelle (ANAND-IVELL et al., 2006) übt INSL3 bei der immaturren Ratte einen parakrin vermittelten anti-apoptotischen Effekt auf die Keimzellen aus (KAWAMURA et al., 2004). Wie ANAND-IVELL et al. (2009) gezeigt haben, scheint im Interstitium

produziertes INSL3 die Blut-Hoden-Schranke der Ratte passieren zu können. Als weitere Funktion des INSL3 nennen NEF und PARADA (1999) und ZIMMERMANN et al. (1999) dessen fördernden Einfluss auf die transabdominale Phase des Descensus testis.

2.5.2.4 Oxytocin

Bei dem zyklischen Peptid Oxytocin handelt es sich um ein Hormon, welches vorwiegend im Hypothalamus, aber auch außerhalb des Gehirns gebildet wird (DÖCKE, 1994a), zum Beispiel im Hoden der Ratte und des Mannes (NICHOLSON et al., 1984) sowie der Prostata des Mannes (WHITTINGTON et al., 2004). Im caninen Hoden wurde Oxytocin in den Leydigzellen nachgewiesen (PICKERING et al., 1989), jedoch fehlt für den Hund eine grundlegende Information über das testikuläre Vorkommen eines entsprechenden Rezeptors (TRAAS und KUSTRITZ, 2004). Die intratestikuläre Detektion sowohl des Oxytocins (YEUNG et al., 1988) als auch des Oxytocinrezeptors (BATHGATE und SERNIA, 1994) gelang in den Leydigzellen der Ratte. Entsprechendes gilt für den Weißbüschelaffen, bei welchem zudem auch in einigen Sertolizellen Oxytocin auffindbar war (EINSPANIER und IVELL, 1997). Eine Lokalisierung des Oxytocinrezeptors sowohl in den Leydig- als auch den Sertolizellen ist für den Schafbock (WHITTINGTON et al., 2001) sowie den Makaken und den Menschen (FRAYNE und NICHOLSON, 1998) beschrieben. Trotz fehlenden Nachweises eines in den testikulären peritubulären Myoidzellen der Ratte gelegenen Oxytocinrezeptors (HOWL et al., 1995), beobachteten FRAYNE et al. (1996) einen die Spermiation begünstigenden Einfluss des Oxytocins bei der pubertären Ratte. Im Gegensatz zum Kaninchen (FJELLSTRÖM et al., 1968) zeigen jedoch spermatologische Untersuchungen beim Rüden nach Applikation eines exogenen Oxytocins weder eine Steigerung des mittleren Ejakulatvolumens noch eine Erhöhung der darin enthaltenen mittleren Anzahl an Spermatozoen (TRAAS und KUSTRITZ, 2004).

2.5.2.5 Prostaglandine

Die zur Gruppe der Eicosanoide gehörenden Prostaglandine (LÖFFLER, 1998) sind Abkömmlinge der Arachidonsäure (VAN DORP et al., 1964; LÖFFLER, 1998). Ihr erster Nachweis erfolgte beim Menschen im Sperma sowie den Geweben und Sekreten von Prostata und Samenblase (VON EULER, 1935). Auch im Hoden von Schwein (MICHAEL, 1973),

Ratte (CARPENTER, 1974) und Mensch (CARPENTER et al., 1978) sind Prostaglandine auffindbar. Sowohl für die Ratte (REDDY et al., 1992) als auch den Menschen (CARPENTER et al., 1978) ist eine intratestikuläre, mikrosomale Synthese der Prostaglandine beschrieben. Das qualitativ bedeutendste Produkt stellt bei der Ratte das Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) dar (REDDY et al., 1992). SUZUKI-YAMAMOTO et al. (2007) lokalisierten bei Mäusen die für die Bildung des $PGF_{2\alpha}$ essentiellen Enzyme Cyclooxygenase-1 (COX-1) und $PGF_{2\alpha}$ -Synthase sowie den Signal-vermittelnden Prostaglandin F-Rezeptor (FP) in den Leydigzellen, sodass ein autokriner Einfluss des $PGF_{2\alpha}$ auf die Regulation der murinen Leydigzelle möglich erscheint (SUZUKI-YAMAMOTO et al., 2007). Zellkulturstudien belegen, dass $PGF_{2\alpha}$ beim Syrischen Goldhamster eine dosisabhängige Reduktion der hCG-stimulierten Testosteronsekretion durch verringerte Expression von Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR Protein) und 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (17 β -HSD) hervorruft (FRUNGIERI et al., 2006). Einen weiteren lokal vermittelten Effekt des testikulären $PGF_{2\alpha}$ sehen TRIPICIANO et al. (1998) bei der Ratte in der Beeinflussung der Kontraktilität der peritubulären Myoidzellen, welche zum Transport der Spermien sowie der testikulären Flüssigkeit beitragen (MAEKAWA et al., 1996). Sowohl FARR und ELLIS (1980) als auch TSO und LACY (1975) wiesen bei der Ratte einen modulierenden Einfluss diverser Prostaglandine auf die Kontraktilität der Tubuli seminiferi nach. Während $PGF_{2\alpha}$ die Frequenz der tubulären Kontraktionen erhöhte (TSO und LACY, 1975; FARR und ELLIS, 1980), erniedrigte Prostaglandin E_2 (PGE_2) diese (FARR und ELLIS, 1980). Die Synthese des PGE_2 konnte bei der Ratte in den immaturen und maturen Sertolizellen gezeigt werden (COOPER und CARPENTER, 1987). Bei Mäusen ist ein negativer Einfluss dieses Prostaglandins auf die Spermatogenese beschrieben (ABBATIELLO et al., 1975; ABBATIELLO et al., 1976). So beobachteten ABBATIELLO et al. (1975) bei der adulten Maus nach 15-tägiger Applikation von PGE_2 eine Hemmung der Spermienbildung mit vermehrter intratubulärer Freisetzung unreifer Keimzellen; ein Effekt, der auch beim maturen Rüden nachweisbar war (MOSKOVITZ et al., 1987).

2.5.2.6 GnRH-like Faktor

Das Vorkommen des als GnRH-like Factor bezeichneten extrahypothalamischen Peptids ist sowohl im Hoden von Mensch (SHARPE und FRASER, 1980a) und Ratte (BHASIN

und SWERDLOFF, 1984) als auch im Seminalplasma des Menschen (CHAN und TANG, 1983) beschrieben worden. Seine intratestikuläre Lokalisation gelang beim Menschen in der die Leydigzellen umgebenden Gewebeflüssigkeit (SHARPE und FRASER, 1980a) und bei der Ratte im Zytoplasma der Leydigzellen sowie im Zellkern besonders basal gelegener Spermatogonien (PAULL et al., 1981). Während PAULL et al. (1981) die Synthese des GnRH-like factors in den Leydigzellen vermuten, identifizierten SHARPE et al. (1981) im in vitro Versuch die Sertolizellen von Ratten als Sekretionsorgan des GnRH-like factors. Aufgrund der bei Ratten ebenfalls im Interstitium (BOURNE et al., 1980; BAHK et al., 1995) bzw. in den Leydigzellen (CLAYTON et al., 1980; SHARPE und FRASER, 1980b) nachgewiesenen GnRH-Rezeptoren, postulieren BAHK et al. (1995) einen im Hoden möglicherweise parakrinen Einfluss des GnRH-like factors. Eine funktionelle Bedeutung des GnRH-like factors liegt in der bei Ratten im in vitro Versuch beobachteten dosisabhängigen Hemmwirkung auf die testikuläre Testosteronsynthese (BHASIN und SWERDLOFF, 1984).

2.5.2.7 Ghrelin

Bei dem erstmals aus dem Magen der Ratte extrahierten Peptid Ghrelin handelt es sich um einen Wachstumshormon-freisetzenden, endogenen Liganden des Growth Hormon Secretagogue (GHS)-Rezeptors (KOJIMA et al., 1999). Während beim Hund das Vorliegen eines Vorläufers des Ghrelins bislang lediglich im Fundus und Corpus des Magens nachgewiesen ist (TOMASETTO et al., 2001), beschreiben GNANAPAVAN et al. (2002) die mRNA-Expression des Ghrelins in einer Vielzahl verschiedener humaner Gewebe, unter anderem der Hypophyse und dem Hoden. Auch für die Ratte ist eine testikuläre Expression der Ghrelin-mRNA belegt (TENA-SEMPERE et al., 2002). Die intratestikuläre Lokalisation des Proteins im adulten Individuum gelang bei der Ratte in den Leydigzellen (TENA-SEMPERE et al., 2002), beim Menschen sowohl in den Leydig- als auch den Sertolizellen (GAYTAN et al., 2004; ISHIKAWA et al., 2007). Der entsprechende funktionale GHS-Rezeptor Typ 1a ist in den Leydig- und Sertolizellen der adulten Ratte (BARREIRO et al., 2003) sowie den Leydig-, Sertoli- und Keimzellen des adulten Menschen (GAYTAN et al., 2004) nachweisbar. Die Möglichkeit eines direkten Einflusses des Ghrelins auf die Hodenfunktion belegen erstmals TENA-SEMPERE et al. (2002), welche in vitro einen

dosisabhängigen Hemmeffekt dieses Peptids auf die hCG- und cAMP-stimulierte Testosteronsekretion der Ratte aufzeigten. In Bezug auf den Menschen beobachteten ISHIKAWA et al. (2007) eine negative Korrelation zwischen der Anzahl Ghrelin-exprimierender Leydigzellen und der Testosteronkonzentration im Serum.

Über die testikuläre Wirkung hinausgehend beeinflusst Ghrelin die Funktionalität der Hypothalamus-Hypophysen-Hoden-Achse (DUPONT et al., 2010). So beobachteten LEBRETHON et al. (2007) bei sexuell maturen männlichen Ratten nach Verabreichung von Ghrelin eine erniedrigte hypothalamische Freisetzungsfrequenz des GnRH. Desweiteren weisen adulte männliche Ratten nach kontinuierlicher Langzeitapplikation von Ghrelin eine signifikant reduzierte Sekretion der hypophysären Gonadotropine auf (MARTINI et al., 2006). Übereinstimmende Ergebnisse existieren auch für den Mann, welcher nach pulsatiler Ghrelin-Gabe eine signifikante Abnahme der Blutplasmakonzentration an LH (KLUGE et al., 2007) und FSH (KLUGE et al., 2009) erfährt.

2.6 Wirkung des Steroidhormons Testosteron

2.6.1 Genomische Wirkung

2.6.1.1 Androgenrezeptor

Der Androgenrezeptor (AR) als „klassischer Steroidhormonrezeptor“ (KANG et al., 2003) stellt einen Liganden-modulierten Transkriptionsfaktor der Kernrezeptor-Superfamilie Typ I dar (FORMAN und SAMUELS, 1990; MANGELSDORF et al., 1995). Sein entsprechendes Gen ist beim Mensch X-chromosomal perizentromer (MIGEON et al., 1981; LUBAHN et al., 1988) im Bereich q11 → q12 (BROWN et al., 1989) lokalisiert und besteht aus acht Exons (KUIPER et al., 1989). Gemäß BRINKMANN et al. (1989a) weist das humane AR-Gen einen Open Reading Frame von 2751 bp auf. Entsprechend ist für den Hund ein offener Leserahmen mit insgesamt 2721 bp identifiziert, welcher die genetische Expression des aus 907 Aminosäuren bestehenden sowie theoretisch 98,7 kDa schweren caninen AR-Proteins erlaubt (LU et al., 2001). Auch beim Menschen beträgt die rechnerisch ermittelte Molekularmasse des AR 98,8 kDa (BRINKMANN et al., 1989a), jedoch belegen sowohl BRINKMANN et al. (1989b) als auch VAN LAAR et al. (1989), dass es sich bei

diesem real um ein 110 kDa schweres Protein handelt. Zudem beschreiben WILSON und MCPHAUL (1996) in einer Vielzahl verschiedener reproduktiver sowie nicht-reproduktiver humaner Gewebe die Existenz einer weitaus selteneren Isoform des humanen AR-Proteins mit lediglich 87 kDa.

Der AR lässt sich funktionell in drei wesentliche Abschnitte untergliedern: die eine hohe Variabilität aufweisende N-terminal Domain (NTD), sowie die beiden über eine Hinge Region verbundenen, hochkonservierten Bindungsdomänen DNA-binding Domain (DBD) und Ligand-binding Domain (LBD) (GAO et al., 2005; KOOCHKEPOUR, 2010).

2.6.1.2 Abruf der genomischen Wirkung

In ungebundenem Zustand weist der AR in der Zielzelle eine vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation auf (TYAGI et al., 2000; LOY et al., 2003). Seine heterokomplexe Struktur wird durch die Assoziation mit den Chaperonen Heat Shock Protein (HSP) 90, HSP 70 und HSP 56 bedingt (VELDSCHOLTE et al., 1992). Das HSP 90 ist an den AR über dessen LBD gebunden (MARIVOET et al., 1992; NEMOTO et al., 1994) und dient der Aufrechterhaltung der gegenüber dem Liganden hochaffinen Konformation des AR (FANG et al., 1996). Testosteron und 5 α -DHT fungieren als physiologische Liganden (ROY und CHATTERJEE, 1995). Nach Bindung des Liganden an die LBD ist neben der Dissoziation der HSP (VELDSCHOLTE et al., 1992) auch eine Konformationsänderung des AR zu beobachten, welche mit der räumlichen Annäherung der aminoterminalen NTD und der carboxyterminalen LBD (intramolekulare N/C-Interaktion) einhergeht (SCHAUFLELE et al., 2005). Der Liganden-gebundene AR erfährt innerhalb von 15 bis 60 Minuten eine Translokation in den Kern (TYAGI et al., 2000). Die intranukleären Abläufe beschreiben VAN ROYEN et al. (2012) wie folgt:

Im Kern angekommen erfährt der überwiegende Teil der AR über die in der DBD gelegene Dimerization-Box (D-Box) eine intermolekulare N/C-Interaktion. Zwischen den entstandenen AR-Homodimeren und den AR-Monomeren bildet sich eine stabile Population aus. Während die Homodimere mit dem Zielgen sowohl über ein high-affinity als auch ein low-affinity Androgen Response Element (ARE) in Kontakt treten, gelingt dieses den Monomeren nur bei Bindung zweier einzelner AR-Moleküle an ein high-

affinity ARE und nachfolgender Dimerisierung. Die sich anschließende Aufhebung der N/C-Interaktionen erlaubt den DNA-gebundenen AR die Bindung von Coregulatoren und initiiert somit die Transkription.

2.6.2 Nicht-genomische Wirkung

Die bereits innerhalb weniger Sekunden bis Minuten resultierenden nicht-genomischen Hormonwirkungen der Androgene erfolgen Membran-vermittelt und ohne Beteiligung von Transkriptions- und Translationsvorgängen, wobei eine nachfolgende Aktivierung der genomisch vermittelten Hormonwirkung nicht auszuschließen ist (FORADORI et al., 2008). In Bezug auf die Sertolizellen sind bislang zwei verschiedene „nicht-klassische“ Wirkmechanismen des Testosterons identifiziert (WALKER, 2010). So bewirkt Testosteron zum einen einen innerhalb weniger Sekunden erfolgenden intrazellulären Ca^{2+} -Influx (GORCZYNSKA und HANDELSMAN, 1995; VON LEDEBUR et al., 2002), zum anderen aktiviert es unter Einbeziehung der Tyrosinkinase *Src* (sarcom) und des Epidermal Growth Factor (EGF)-Rezeptors die Mitogen-Activated Protein (MAP)-Kinase Kaskade und nachfolgend das cAMP-Response Element-binding (CREB)-Protein (CHENG et al., 2007).

Eine funktionelle Bedeutung der „nicht-genomischen“ bzw. „nicht-klassischen“ Wirkungen des Testosterons für die Sertolizelle scheint in der Verbesserung sowohl der interzellulären Kommunikation der Gap Junctions (LYNG et al., 2000) als auch der Adhäsion und Freisetzung der Keimzellen (WALKER, 2010) zu bestehen.

2.7 Proliferation und Apoptose des Hodens

2.7.1 Proliferation

Allgemein ist unter der Proliferation eine im Rahmen des Zellzyklus erfolgende quantitative Zunahme der Zellzahl zu verstehen (PARDEE, 1989).

Der Zellzyklus ist in die im Wechsel auftretende Mitose- und Interphase untergliedert (LIEBICH, 1999b). Die stoffwechselaktive Interphase bezeichnet somit den zwischen den mitotischen Zellteilungen gelegenen Zeitraum und wird in die von HOWARD und PELC

(1986) definierte Gap₁ (G₁)-, Synthese (S)- und Gap₂ (G₂)-Phase unterschieden (PATT und QUASTLER, 1963). PATT und QUASTLER (1963) benennen zudem die Gap₀ (G₀)-Phase mit einer als „resting reserve“ fungierenden Zellpopulation. Diese besteht aus vorübergehend oder dauerhaft teilungsinaktiven, vollständig ausdifferenzierten postmitotischen Zellen (LIEBICH, 2000). Der Eintritt einer in der G₀- bzw. frühen G₁-Phase befindlichen Zelle in die Proliferation unterliegt der Anregung durch eine Vielzahl von Mitogenen, unter anderem den Rezeptor-vermittelten Wachstumsfaktoren (GILLETT und BARNES, 1998). Funktionell dient die mit der RNA- und Proteinsynthese einhergehende G₁-Phase sowohl dem zytoplasmatischen Zellwachstum als auch der Vorbereitung auf die S-Phase, in welcher schließlich die Replikation der DNA sowie die Synthese der hierfür erforderlichen chromosomalen Proteine erfolgt (LIEBICH, 2000). Die prämitotische G₂-Phase ist durch die Bildung bzw. Freisetzung der eigens die Zellteilung betreffenden Proteine und der beginnenden Kondensation der Chromosomen gekennzeichnet (PRESCOTT, 1968). Mit Vollendung der Interphase setzt die in Pro-, Prometa-, Meta-, Ana- und Telophase gegliederte Mitose ein (LIEBICH, 2000).

2.7.1.1 Ki-67

Das als Non-Histon-Protein (GERDES et al., 1991) identifizierte Ki-67 wurde erstmals durch GERDES et al. (1983) als Antigen des murinen monoklonalen Antikörpers Ki-67 in proliferierenden menschlichen Gewebezellen detektiert. Der Terminus „Ki-67“ leitet sich sowohl von dem Herstellungsort des Antikörpers (Kiel) als auch der Nummer dessen originären, in einer 96-Well-Plate befindlichen Zellklons ab (SCHOLZEN und GERDES, 2000).

Das im Nukleus proliferierender Zellen aufgefundene humane Protein Ki-67 (pKi-67) (GERDES et al., 1983) ist durch ein annähernd 30000 bp großes (DUCHROW et al., 1996), auf dem Chromosom 10 lokalisiertes (SCHONK et al., 1989; FONATSCH et al., 1991) Gen codiert. Seine Primärstruktur wurde von SCHLÜTER et al. (1993) beschrieben. Während beim Menschen zwei Isoformen des pKi-67 mit einer molekularen Masse von 345 kDa bzw. 395 kDa identifiziert wurden (GERDES et al., 1991), fanden SCHOLZEN et al. (1997) (Abstract) in murinen Tumorzellen vier auf alternativem Splicing basierende Varianten des Proteins. Neben der durch GERDES et al. (1984) beobachteten ausschließlichen Lokalisa-

tion des pKi-67 in der aktiven G₁-, S-, G₂ und Mitose-Phase des Zellzyklus, geben BULLWINKEL et al. (2006) erste Hinweise auf das Vorkommen des Antigens auch in ruhenden Zellen. Die spezifische intranukleäre Lokalisation des pKi-67 ist dem Verlauf des Zellzyklus angepasst (BROWN und GATTER, 2002). Hinsichtlich der funktionellen Bedeutung von pKi-67 belegen Untersuchungen von BULLWINKEL et al. (2006) und RAHMANZADEH et al. (2007) dessen Teilnahme an der frühen rRNA-Synthese. Die Eignung des pKi-67 als Marker der Proliferation beschreiben bereits GERDES et al. (1983, 1984). Einen Überblick über die frühe histopathologische Verwendung des monoklonalen Ki-67-Antikörpers geben BROWN und GATTER (1990).

2.7.2 Apoptose

Als „Apoptosis“ definieren erstmals KERR et al. (1972) eine bis dahin als „shrinkage necrosis“ (KERR, 1965; KERR, 1971) bezeichnete Form des aktiven, programmierten Zelltods, welche der physiologischen Regulation einer Zellpopulation dient (KERR et al., 1972).

Histologisch manifestiert sich die Apoptose im Auftreten sogenannter „apoptotic bodies“, Membran-gebundener zellulärer Überreste, welche aus der Kondensation von Zytoplasma und nukleärem Chromatin, der Degradierung des Zellkerns und schließlich der Fragmentierung der Zelle resultieren (KERR et al., 1972).

2.7.2.1 Apoptose im Rahmen der Spermatogenese

Studien zur quantitativen Ausbeute der Spermatogenese belegen degenerationsbedingte Verluste (ROOSEN-RUNGE, 1955, OAKBERG, 1956). So beschreiben KRISHNAMURTHY et al. (1998) bei der Maus einen Verlust von ungefähr 2 % aller Keimzellen zu jedem Zeitpunkt der Spermatogenese, während SWIERSTRA und FOOTE (1963) von einer letztlich um insgesamt 24 % reduzierten Ausbeute an Spermatiden beim Kaninchen berichten. Untersuchungen der Spermatogoniogenese zeigen eine Keimzelldegeneration von 10,6 % (CLERMONT, 1962) bzw. circa 75 % bei der Ratte (HUCKINS, 1978) und 66 % bei dem chinesischen Hamster (DE ROOIJ und LOK, 1987). Im Verlauf der Spermatozytogenese und Spermiogenese beobachteten CLERMONT (1962) bei der Ratte eine um 27,4 % und OAKBERG (1956) eine um 13 % verminderte Ausbeute an Spermatiden.

Der beschriebene Keimzellverlust resultiert aus einem apoptotischen Zelluntergang (BRINKWORTH et al., 1995; BLANCO-RODRÍGUEZ und MARTÍNEZ-GARCÍA, 1996; HIKIM et al., 1998). Dieser konnte im Verlauf der physiologischen Spermatogenese bei der Ratte (BRINKWORTH et al., 1995; BLANCO-RODRÍGUEZ und MARTÍNEZ-GARCÍA, 1996), dem Meerschwein (HINGST und BLOTTNER, 1995), dem Kaninchen (BLANCO-RODRÍGUEZ, 2002a), der Katze (BLANCO-RODRÍGUEZ, 2002b), dem Reh (HINGST und BLOTTNER, 1995), dem Rind (HINGST und BLOTTNER, 1995), dem Pferd (HENINGER et al., 2004) und dem Menschen (HIKIM et al., 1998) nachgewiesen werden. Obwohl die Apoptose in nahezu allen Keimzelltypen und in fast jedem Stadium des Keimepithelzyklus beobachtet werden konnte (BLANCO-RODRÍGUEZ und MARTÍNEZ-GARCÍA, 1996), wiesen BLANCO-RODRÍGUEZ et al. (2003) bei Maus, Ratte, Kaninchen und Katze sowie HENINGER et al. (2004) beim Pferd nach, dass vornehmlich Spermatogonien und Spermatozyten Stagespezifisch in Abhängigkeit der mitotischen und meiotischen Teilungen betroffen sind. OAKBERG (1956) sieht in diesem Zelluntergang eine funktionelle Bedeutung im Hinblick auf die Eliminierung chromosomal geschädigter Keimzellen. Nach HUCKINS (1978) und LEE et al. (1997) scheint zudem eine apoptotische Degeneration überzähliger Keimzellen als Folge der begrenzten funktionellen Kapazität der Sertolizellen möglich.

Neben der im Rahmen der Spermatogenese spontan auftretenden Apoptose (BLANCO-RODRÍGUEZ und MARTÍNEZ-GARCÍA, 1996) bedingen bei der Ratte desweiteren Minderungen der Gonadotropin- (TAPANAINEN et al., 1993; MARATHE et al., 1995; MEACHEM et al., 1999; RUWANPURA et al., 2008) oder Testosteronsekretion (TROIANO et al., 1994; BAKALSKA et al., 2004), Hypo- (BLANCO-RODRÍGUEZ und MARTÍNEZ-GARCÍA, 1997) und Hyperthermie (BLANCO-RODRÍGUEZ und MARTÍNEZ-GARCÍA, 1998), radioaktive (HENRIKSÉN et al., 1996) und elektromagnetische (SAYGIN et al., 2011) Strahlung sowie verschiedene proapoptotischen Agentien (BLANCO-RODRÍGUEZ und MARTÍNEZ-GARCÍA, 1998) die apoptotische Keimzelldegeneration.

2.7.2.2 Apoptotische Signaltransduktion

Die den apoptotischen Untergang männlicher Keimzellen auslösende Signaltransduktion erfolgt sowohl über einen intrinsischen, mitochondrial vermittelten als auch einen extrin-

sischen, Tumor Necrosis Factor Receptor (TNFR)-vermittelten Signalweg (SHAHA, 2007). Der intrinsische Mechanismus wird durch eine Vielzahl extra- und intrazellulärer Signale ausgelöst (NUÑEZ et al., 1998). Beispielsweise verursacht das zelluläre Vorkommen schadhafter DNA eine mittels Aktivierung proapoptotischer Proteine bedingte Öffnung mitochondrialer Poren, sodass es zur intrazytoplasmatischen Freisetzung des mitochondrialen Cytochrom C kommt (FAN et al., 2005). In der Folge geht das Cytochrom C mit dem „Apoptosis-inducing factor-1“ (Apaf-1) eine Verbindung ein (ZOU et al., 1997), welche, in Gegenwart des Nukleotids Adenosintriphosphat (ATP) oder auch Desoxy-Adenosintriphosphat (dATP) (REUBOLD et al., 2009), mit weiteren Apaf-1/Cytochrom C-Komplexen zu einem radförmigen, regulär heptameren Apoptosom oligomerisiert (ACEHAN et al., 2002). Via Apoptosom erfolgt die Aktivierung des Zymogens Procaspase-9 (SHI, 2002). Die aktivierte Caspase-9 schließlich erfährt eine Loslösung vom Apoptosom (ZOU et al., 1999) und dient der proteolytischen Aktivierung der exekutiven Procaspasen-3 und Procaspase-7 (RENATUS et al., 2001; FAN et al., 2005).

Die extrinsische Initiation der apoptotischen Effektor-Caspasen erfolgt Rezeptor-vermittelt (CHOWDHURY et al., 2008). Sie bedarf der Bindung eines Liganden aus der Tumor Necrosis Factor (TNF)-Superfamilie an den entsprechenden Rezeptor (GUICCIARDI und GORES, 2009). Neben dem TNF-Rezeptor 1 (TNF-R1) sowie dem TNF-related Apoptosis-inducing Ligand-Rezeptor 1 und 2 (TRAIL-R1 und -R2) ist Fas einer der am ausführlichsten erforschten Todesrezeptoren (GUICCIARDI und GORES, 2009). Auch im Hinblick auf die Apoptose der testikulären Keimzellen legen Untersuchungen eine besondere Bedeutung des Fas-Systems nahe (LEE et al., 1997; PENTIKÄINEN et al., 1999; NAIR und SHAHA, 2003). Aufgrund der intratubulär vorliegenden Verteilung des Fas und seines Liganden (FasL) vermuten LEE et al. (1997) und FRANCAVILLA et al. (2000) eine parakrin initiierte Apoptose der Fas-exprimierenden testikulären Keimzellen. Die apoptotische Signaltransduktion wird durch Interaktion des FasL mit dem über eine Pre-ligand Binding Assembly Domain (PLAD) trimerisierten Fas-Komplex eingeleitet (SIEGEL et al., 2000). Dabei induziert der FasL eine Konformationsänderung des Rezeptorkomplexes, welcher in der Folge via Death Domain (DD) das adaptive Fas-associated Protein with Death Domain (FADD) homotypisch bindet (GUICCIARDI und GORES, 2009). Das FADD wiederum weist an seinem N-terminalen Ende eine Death Effector Domain (DED) auf (CHINNAIYAN et al.,

1995), die mit einer DED sowohl der Procaspase-8 (MUZIO et al., 1996; MEDEMA et al., 1997) als auch der Procaspase-10 (WANG et al., 2001) in Wechselwirkung zu treten scheint. Es resultiert der aus Fas, FADD und dem Zymogen der Caspase-8 bzw. der Caspase-10 bestehende Death-inducing Signaling Complex (DISC), an welchem sich schließlich die Aktivierung der entsprechenden gebundenen Procaspase-8 und 10 vollzieht (LAUNAY et al., 2005). Die Caspasen-8, -9 und -10 fungieren als Initiatoren einer Caspase-Kaskade, welche in der Aktivierung der den apoptotischen Zelluntergang auslösenden Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 resultiert (FAN et al., 2005).

2.7.2.2.1 Caspase-3 Eine zentrale Bedeutung in der apoptotischen Zelldegeneration besitzen die der Familie der Interleukin-1 β -converting Enzyme (ICE) angehörenden Aspartat-spezifischen Cysteinproteasen (FAN et al., 2005), die sogenannten Caspasen (ALNEMRI et al., 1996). Insgesamt sind bei Säugetieren bislang 14 Caspasen identifiziert (FAN et al., 2005), welche entsprechend ihrer strukturellen Homologie (FAN et al., 2005; CHOWDHURY et al., 2008) sowie ihrer funktionellen Bedeutung (CHOWDHURY et al., 2008) in apoptotische Aktivator-/Initiator- bzw. Exekutor/Effektor-Caspasen sowie Entzündungsmediatoren unterschieden werden (vgl. Tabelle 2.3).

Tabelle 2.3: Caspasen der Säugetiere

Caspase		
Apoptose	Aktivator	2, 8, 9 und 10
	Exekutor	3, 6 und 7
Inflammation	Mediator	1, 4, 5, 11, 12, 13 und 14

Die exekutive Caspase-3, auch CPP32, Apopain oder Yama genannt (CHOWDHURY et al., 2008), nimmt innerhalb der apoptotischen Caspase-Kaskade eine Schlüsselrolle ein (FAN et al., 2005). Ihre Aktivierung erfolgt sowohl im Rahmen des intrinsischen als auch des extrinsischen apoptotischen Signalweges (NUÑEZ et al., 1998; GRÜTTER, 2000; BOATRIGHT und SALVESEN, 2003; CHOWDHURY et al., 2008). Der aktivierten Caspase-3 stehen als Substrate nicht nur die Procaspasen-3, -6 und -9, sondern auch diverse Zellproteine zur Verfügung (FAN et al., 2005). So erfolgt beispielsweise die enzymatische Zerstörung der

das Zytoskelett bildenden Proteine Fodrin, Gelsolin, Lamin B und Vimentin (SLEE et al., 2001) sowie Actin (MASHIMA et al., 1997) direkt, während die des Lamin A indirekt mittels Aktivierung der Caspase-6 gelingt (SLEE et al., 2001). Auch die zelluläre Fragmentation der DNA wird indirekt durch das von der Effektor-Caspase-3 aktivierte Substrat Caspase-activated Deoxyribonuclease (CAD) verursacht (ENARI et al., 1998; SAKAHIRA et al., 1998).

3 Material und Methode

Sämtliche Informationen zu den in diesen Untersuchungen angewandten besonderen Materialien sowie Software-Programmen finden sich in den Kapiteln 3.11 bis 3.15.

3.1 Versuchstiere

Der Versuchstierpool bestand ursprünglich aus 39 allgemein- und geschlechtsgesunden, im Alter von 11 bis 83 Monaten befindlichen Rüden der Rasse Beagle, welche von den Pharmazeutischen Unternehmen Sanofi-Aventis, Deutschland (33 Rüden) und Intervet, Frankreich (6 Rüden) zur Verfügung gestellt worden waren.

Bei den letztgenannten sechs Tieren (Elias, Elliott, Joni alias Jonathan, Monty alias Julien, Paul alias Jackson und Pawlow alias Jeremi) war bereits im Juli 2004 eine Downregulation mit dem GnRH-Analogon „Gonazon[®]“ vorausgegangen, wobei nach Aufhebung dieses Effekts eine vollständige Rekrudescenz der Spermatogenese beobachtet werden konnte (LUDWIG, 2008).

Weiterhin lagen aus dem Patientenpool der Klinik für Geburtshilfe und Gynäkologie der Veterinärmedizinischen Fakultät, Uludag Universität Bursa, Türkei für die histologischen und molekularbiologischen Untersuchungen die Hoden von fünf juvenilen, 2 bis 2,5 Monate alten Hunden unbekannter Rasse vor.

Eine Übersicht der Zuordnung aller Rüden sowie der juvenilen Hodengewebe zu Versuchsgruppen und Kastrationszeitpunkten findet sich in Tabelle 3.1 auf Seite 43 f.

Tabelle 3.1: Zuordnung der Rüden zu Versuchsgruppen und Kastrationszeitpunkten

Versuchsgruppe	Zeitpunkt der Kastration	Hund (Alter Studieneintritt)	Sonstiges
Versuchsgruppe „Gonazon®“	Woche 0 (Explantation GnRH-Analogon)	Percy (17 Monate) ¹	
		Paul (81 Monate) ^{1,a,*}	Diss. LUDWIG (2008)
		Nick (15 Monate) ¹	
		Luca (15 Monate) ¹	
	Woche 3 post explantationem	Elias (77 Monate) ¹	Diss. LUDWIG (2008)
		Speedy (15 Monate) ¹	
		TheoH (15 Monate) ¹	
		LeoB (14 Monate) ¹	
	Woche 6 post explantationem	Spikey (11 Monate) ¹	
		Strolch (16 Monate) ¹	
		Snoopy (14 Monate) ¹	
		LeoS (15 Monate) ¹	
	Woche 9 post explantationem	Joni (78 Monate) ^{1,*}	Diss. LUDWIG (2008)
		Mortimer (13 Monate) ¹	
		Bruno (13 Monate) ¹	
		JoschiF (14 Monate) ¹	
	Woche 12 post explantationem	Shy (43 Monate) ¹	
		Captain Kirk (19 Monate) ¹	
		Elliott (83 Monate) ¹	Diss. LUDWIG (2008)
	Woche 15 post explantationem	Kaspar (42 Monate) ¹	
		Berry (13 Monate) ¹	
		Monty (80 Monate) ^{1,*}	Diss. LUDWIG (2008)
	Woche 18 post explantationem	Bobby (13 Monate) ¹	
		Lucky (13 Monate) ¹	
		Lex (40 Monate) ¹	

Tabelle 3.1: Fortsetzung (Tabellenbeschriftung siehe Tabelle 3.1., Seite 43)

Versuchsgruppe	Zeitpunkt der Kastration	Hund (Alter Studieneintritt)	Sonstiges
Versuchsgruppe „Gonazon®“	Woche 21 post explantationem	Pawlow (73 Monate) ^{1,*}	Diss. LUDWIG (2008)
		Feivel (13 Monate) ¹	
		Bogus (13 Monate) ¹	
	Woche 24 post explantationem	TheoJ (17 Monate) ¹	
		JoschiP (11 Monate) ¹	
Sydney (13 Monate) ¹			
Versuchsgruppe „Kontrolle adult“ (unbehandelt)		Ben (14 Monate) ¹	
		Charlie (31 Monate) ¹	
		Horst (14 Monate) ¹	
		Soto (31 Monate) ¹	
		Tom (14 Monate) ¹	
Versuchsgruppe „Profact®“	Woche 0 (Explantation des GnRH-Analogons)	Floh (16 Monate) ¹	
		Hansi (16 Monate) ¹	
		Sid (16 Monate) ¹	
Versuchsgruppe „juvenil“ (unbehandelt)		Lucky (2 - 2,5 Monate) ^{2,b}	
		Jack (2 - 2,5 Monate) ²	
		Joe (2 - 2,5 Monate) ^{2,b}	
		Averell (2 - 2,5 Monate) ²	
		William (2 - 2,5 Monate) ²	

Rüden bzw. Gewebeproben der

¹ Pharmazeutische Unternehmen Sanofi-Aventis, Deutschland und Intervet, Frankreich

² Veterinärmedizinische Fakultät, Uludag Universität Bursa

* Dissertation LUDWIG (2008): Paul (Jackson), Joni (Jonathan), Monty (Julien), Pawlow (Jeremi)

^a Ausschluss aus dem Versuchstierpool aufgrund eines testikulären Tumors

^b Ausschluss aus dem Versuchstierpool aufgrund einer juvenilen Orchitis

3.1.1 Tierversuchsantrag

Die Genehmigung des Tierversuchsantrages erfolgte durch das Regierungspräsidium Giessen unter dem AZ V54-19c20/15c GI18/14.

3.1.2 Versuchstierhaltung

Alle Hunde wurden im Anschluss an die Aufnahmeuntersuchung und Implantation eines GnRH-Analogons („Gonazon[®]“ oder „Profact[®] Depot“) bzw. nach Kastration an Privatpersonen übergeben. Eine artgerechte Haltung und konventionelle Fütterung der Tiere wurde vorausgesetzt. Die Tierhalter verpflichteten sich, entsprechend des individuellen Probenprotokolls in der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz, JLU Giessen vorstellig zu werden. In Ausnahmefällen wurde einer terminlichen Verschiebung der Kontrolluntersuchung bzw. deren Durchführung durch den Haustierarzt stattgegeben. Nach der chirurgischen Kastration, welche die Beendigung der Studienteilnahme darstellte, gingen alle Tiere in den Besitz ihrer Halter über.

Alle der Klinik für Geburtshilfe und Gynäkologie der Veterinärmedizinischen Fakultät, Uludag Universität Bursa, Türkei zur Kastration vorgestellten Tiere, deren Hoden in die Versuchsgruppe „juvenil“ eingingen, waren zu diesem Zeitpunkt in einem Tierheim untergebracht.

3.2 Versuchsziel und -aufbau

Hauptziel der Untersuchungen war die Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Rekrudescenz der Spermatogenese nach erfolgreicher hormoneller Downregulation und deren gezielter Aufhebung durch Entfernung des das GnRH-Analogon Azagly-nafarelin (18,5 mg) enthaltenden Implantates „Gonazon[®]“. Die vergleichende Beurteilung, in wie weit eine vollständige Wiederherstellung der Spermatogenese eingetreten war, erfolgte an Hand der Versuchsgruppe „Kontrolle adult“ (siehe unten).

Ein weiteres Ziel war es, erste Informationen hinsichtlich des Grades der Downregulation

bei Anwendung von „Gonazon®“ im Vergleich zu dem in früheren Untersuchungen herangezogenen und den GnRH-Agonisten Buserelinacetat (6,6 mg) enthaltenden Implantat „Profact® Depot“ zu erhalten.

Die Untersuchungen an den juvenilen Hoden dienten ebenfalls ausschließlich vergleichenden Zwecken.

- Versuchsgruppe „Gonazon®“:

Diese Gruppe stand im Fokus der Untersuchungen. Mit dem Ziel, jeweils drei bis vier Rüden in 3-wöchigem Abstand über einen Gesamtzeitraum von 24 Wochen zu kastrieren, wurden dieser Gruppe zunächst 31 Rüden zugeteilt und nach dem Zufallsprinzip den vorgesehenen Kastrationszeitpunkten zugeordnet (siehe Tabelle 3.1). Aufgrund der histologischen Identifikation eines testikulären Tumors wurde ein Hund (Paul) nachträglich von der Studie ausgeschlossen, sodass die Gruppe letztlich aus 30 Hunde bestand.

Allen Rüden wurde unmittelbar nach der erfolgreichen Aufnahmeuntersuchung das GnRH-Analogon Azagly-nafarelin (18,5 mg) in Form des Implantates „Gonazon®“ verabreicht (siehe Kapitel 3.2.1.3). Der Wirkeintritt wurde in der vierten und achten, sowie gegebenenfalls ein weiteres Mal in der zwölften Wochen post implantationem durch Erfassung der Testosteronwerte kontrolliert. Nach einer Verweildauer von fünf Monaten erfolgte bei allen Rüden die chirurgische Entfernung des noch vollständig wirksamen Implantates (Woche 0). Gleichzeitig wurde von allen Tieren eine Blutprobe gewonnen. Vier Hunde erfuhren im direkten Anschluss daran die chirurgische Kastration. Die weiteren Orchidektomien erfolgten zu den in Tabelle 3.1 angegebenen Zeitpunkten. Nach der Implantatentfernung wurden alle Hunde bis zu ihrer chirurgischen Kastration einer wöchentlichen Kontrolluntersuchung unterzogen.

Die bei den jeweiligen Untersuchungen erhobenen Parameter unterteilten sich wie folgt in:

- a) bis zum Zeitpunkt der Kastration erfasste Parameter:
 - * FSH-, LH- und Testosteronkonzentration im peripheren Blutplasma,
 - * Hoden- und Prostatagröße,

- b) nach der Kastration erfasste Parameter:
 - * histologisch-morphologisch feststellbaren Veränderungen im Erscheinungsbild des Hodens,
 - * Expression des Androgenrezeptors sowie
 - * Proliferation und Apoptose.
- Versuchsgruppe „Kontrolle adult“:

Die dieser Gruppe zugeordneten fünf Rüden wurden nach Abschluss der Aufnahmeuntersuchung mit Feststellung ihrer Operations- und Narkosefähigkeit einer Orchidektomie unterzogen.
- Versuchsgruppe „Profact®“:

Eine weiterführende Fragestellung beschäftigte sich mit der Vergleichbarkeit des Zustandes der hormonellen Downregulation durch das Präparat „Gonazon®“ und durch das der selben pharmakotherapeutischen Gruppe zugehörige Präparat „Profact® Depot“, einem Buserelinacetat (6,6 mg) enthaltenden und zur Anwendung in der Humanmedizin zugelassenen Implantat.

Die Versuchsgruppe bestand aus drei Rüden. Nach Verabreichung des „Profact® Depot“-Implantates erfolgte die Kontrolle des eintretenden Effekts der Downregulation mittels Blutprobenentnahme wie bei der Versuchsgruppe „Gonazon®“ beschrieben. Die Kastration wurde fünf Monate post implantationem im Zustand der Downregulation durchgeführt.
- Versuchsgruppe „juvenil“:

Ein zusätzliches Ziel war es, vergleichende Informationen über den Zustand des downregulierten und des juvenilen Hodens zu erhalten.

Von den im Alter von 2 bis 2,5 Monaten befindlichen fünf Hunden wurden lediglich die Hoden dreier Rüden in die Untersuchung einbezogen, da bei den anderen beiden Tieren (Lucky, Joe) histo-pathologische Veränderungen der Testes (juvenile Orchitis) vorlagen.

Eine schematisierte Darstellung des Versuchsaufbaus zeigt Abbildung 3.1 auf Seite 48.

Aufnahmeuntersuchung (0. Woche)

-Feststellung der allgemeinen klinischen Gesundheit und speziellen andrologischen Geschlechtsge-sundheit

-Zuordnung zu den Versuchsgruppen

↪ **Kastration** (0. Woche) ⇒ **Versuchsgruppe „Kontrolle adult“**
(5 Hunde)

↓

Implantation des GnRH-Analogons („Gonazon[®]“ oder „Profact[®] Depot“) (0. Woche)

↓

Kontrolluntersuchung - (4., 8., ggf. 12. Woche post implantationem)

-Kontrolle des Wirkeintrittes des GnRH-Analogons

↓

Kontrolluntersuchung (5 Monate post implantationem)

-Explantation des GnRH-Analogons „Gonazon[®]“ (Woche 0 post explantationem)

↪ **Kastration** (Woche 0) ⇒ **Versuchsgruppe „Profact[®]“** (3 Hunde)

↪ **Kastration** (Woche 0) ⇒ **Versuchsgruppe „Gonazon[®]“** (4 Hunde)

↓

Wöchentliche Kontrolluntersuchung (Woche 1 bis 24 post explantationem)

-Kontrolle der Rekrudescenz

↪ **Kastration** (Woche 3) ⇒ **Versuchsgruppe „Gonazon[®]“** (4 Hunde)

↪ **Kastration** (Woche 6) ⇒ **Versuchsgruppe „Gonazon[®]“** (4 Hunde)

↪ **Kastration** (Woche 9) ⇒ **Versuchsgruppe „Gonazon[®]“** (4 Hunde)

↪ **Kastration** (Woche 12) ⇒ **Versuchsgruppe „Gonazon[®]“** (3 Hunde)

↪ **Kastration** (Woche 15) ⇒ **Versuchsgruppe „Gonazon[®]“** (3 Hunde)

↪ **Kastration** (Woche 18) ⇒ **Versuchsgruppe „Gonazon[®]“** (3 Hunde)

↪ **Kastration** (Woche 21) ⇒ **Versuchsgruppe „Gonazon[®]“** (3 Hunde)

↪ **Kastration** (Woche 24) ⇒ **Versuchsgruppe „Gonazon[®]“** (3 Hunde)

Abbildung 3.1: Versuchsaufbau

3.2.1 Untersuchungsprotokolle und Probennahme

Sämtliche die Untersuchungsprotokolle sowie die Probennahme betreffenden Angaben beziehen sich ausschließlich auf die Versuchsgruppen „Gonazon®“ bzw. „Profact®“ sowie die „Kontrolle adult“.

3.2.1.1 Aufnahmeuntersuchung

Die Aufnahmeuntersuchung fand in der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintier mit Tierärztlicher Ambulanz, JLU Giessen statt. Neben der Erfassung tierindividueller Daten wie Name, Geschlecht, Rasse, Alter und Tätowierung bzw. elektronische Kennzeichnung erfolgte nach klinischem Standardverfahren eine allgemeine klinische mit anschließender spezieller andrologischer Untersuchung.

Die spezielle andrologische Untersuchung beinhaltete die Adspektion und Palpation von Präputium und Penis (inklusive der Schleimhäute), sowie Skrotum, Testis, Epididymis und Funiculus spermaticus. Sie wurde zudem durch die Ultrasonographie von Hoden und Prostata sowie die Gewinnung und Untersuchung einer Samenprobe ergänzt.

Die ultrasonographische Untersuchung fand im Regelfall am in rechter Seitenlage befindlichen Hund statt. Die Hoden wurden mithilfe eines linearen 7,5 MHz-Schallkopfes sowohl longitudinal als auch transversal auf Auffälligkeiten untersucht. Die Ultrasonographie der Prostata erfolgte unter Zuhilfenahme eines konvexen 5 MHz-Schallkopfes, welcher ausschließlich in longitudinaler Ausrichtung lateral des Präputiums positioniert wurde. Auch diese Untersuchung diente der Sicherung der Geschlechtsgesundheit der Rüden.

Abschließend erfolgte die manuelle Samengewinnung mittels Masturbation bei gleichzeitiger Stimulation durch die Anwesenheit einer läufigen Hündin bzw. durch Applikation des Lockstoffs p-Methyl-Benzoesäure. Während der Absamung wurde auf das vollständige Ablaufen der Reflexkette geachtet. Das Ejakulat wurde nach Möglichkeit fraktioniert (Vorsekret, spermienreiche Fraktion, Nachsekret) aufgefangen. Der grobsinnlichen Bewertung des Ejakulates hinsichtlich Volumen, Farbe, Konsistenz, Beimengungen und Geruch

schloss sich die mikroskopische Untersuchung nach Standardverfahren (HOFFMANN, 2003) an. Es wurde erwartet, dass die Qualität der Ejakulate den in Tabelle 3.2 aufgeführten Mindestanforderungen annähernd genügte.

Tabelle 3.2: Mindestanforderungen an das Ejakulat

Gesamtzahl Spermien	$\geq 0,3 \cdot 10^9$
Vorwärtsbeweglichkeit	$\geq 75 \%$
Pathomorphologisch veränderte Spermien	$< 20 \%$
Kopfkappen-Veränderungen	$\leq 5 \%$
HOS-Test (non-curled)	$\leq 5 \%$
pH-Wert	6,2 bis 7,2

Da das Vorliegen eines einmaligen dysspermen Ergebnisses diagnostisch keine sichere Aussagekraft besitzt (WEITZE, 2001b), wurden im Einzelfall Rüden erneut einer Samengewinnung unterzogen. Letztlich entsprachen die Ejakulate aller Rüden weitgehend den in Tabelle 3.2 vorgegebenen Kriterien.

3.2.1.2 Blutprobennahme

Die Blutproben wurden nach klinischem Standardverfahren durch Punktion der Vena cephalica antebrachii gewonnen. Das Blut wurde in einer mit Lithium-Heparin beschichteten Probenröhre aufgefangen. Blutproben, welche nicht im direkten Anschluss an die Entnahme zentrifugiert werden konnten, wurden im Kühlschrank zwischengelagert. Die Zentrifugation (Heraeus Sepatech Labofuge® 200) selbst erfolgte bei circa 1500 g (4000 U/min) über einen Zeitraum von 5 min. Das überständige Blutplasma wurde in eine etikettierte Reagenz- und Zentrifugenröhre überführt und bis zur Hormonanalyse bei -20 °C bis -23 °C gelagert.

3.2.1.3 Implantation eines GnRH-Analogons

Die Applikation des GnRH-Analogons erfolgte subkutan mithilfe eines in der Primärverpackung des Arzneimittels befindlichen Einmal-Injektors. Während das Präparat „Gonazon®“ paraumbilikal am in seitlicher Rückenlage befindlichen Tier verabreicht wurde, erfolgte die Injektion des Präparates „Profact® Depot“ am stehenden Tier im seitlichen Halsbereich. Eine Lokalanästhesie war hierzu nicht nötig.

3.2.1.3.1 „Gonazon®“ 18,5 mg-Implantat für Hunde Das Präparat „Gonazon®“ enthält als Wirkstoff 18,5 mg des GnRH-Agonisten Azagly-nafarelin.

Die im Rahmen dieser Studie benötigten „Gonazon®“ 18,5 mg-Implantate wurden freundlicherweise durch das Pharmazeutische Unternehmen Intervet Pharma R & D, Frankreich zur Verfügung gestellt.

3.2.1.3.2 „Profact® Depot“ Bei dem Präparat „Profact® Depot“ handelt es sich um ein humanmedizinisches Produkt, welches bereits zuvor zur hormonellen Downregulation der Hodenfunktion beim Rüden angewendet worden war (RIESENBECK et al., 2002). Im Rahmen der vorliegenden Studie kam das 2-Monatsimplantat zur Anwendung, welches als Wirkstoff 6,6 mg des GnRH-Agonisten Buserelinacetat enthält.

Die in dieser Studie angewandten „Profact® Depot“-Implantate wurden freundlicherweise durch das Pharmazeutische Unternehmen Sanofi-Aventis, Deutschland zur Verfügung gestellt.

3.2.1.4 Explantation des GnRH-Analogons „Gonazon®“

Die Explantation erfolgte 5 Monate (Woche 0) post implantationem bei noch bestehender Wirksamkeit. Der paraumbilikale Bereich, in welchem das Implantat ertastet wurde, wurde großzügig ausgeschoren, rasiert und desinfiziert. Nach Verabreichung eines 2 %igen Lokalanästhetikums (Lidocain) wurde das Implantat über einen Hautschnitt entfernt. Die Wunde wurde mit Hautheften verschlossen und mit Silberspray vor möglicher Kontamination geschützt.

3.2.1.5 Kontrolluntersuchungen

Die Kontrolluntersuchungen bei den Rüden der Versuchsgruppen „Gonazon®“ und „Profact®“ deckten den Zeitraum von der Implantation des GnRH-Analogons bis zur chirurgischen Kastration ab.

Bei allen Rüden wurden in der 4. und 8. und ggf. 12. Woche post implantationem sowie unmittelbar vor der Implantatentfernung folgende Untersuchungen durchgeführt bzw. Proben gewonnen:

- Allgemeine klinische Untersuchung
- Spezielle andrologische Untersuchung (exklusive Samenuntersuchung)
- Blutprobennahme.

Im Zeitraum von der Implantatentfernung bis zur chirurgischen Kastration erfolgten wöchentliche Untersuchungen der Tiere, wobei wie oben beschrieben vorgegangen wurde. Lediglich die Untersuchungen von Hoden und Prostata fanden in 3-wöchigen Rhythmus statt.

3.2.1.6 Orchidektomie

Nach Feststellung der Narkose- und Operationsfähigkeit erfolgte die chirurgische Kastration der Rüden. Die Tiere wurden mittels Inhalationsnarkose nach Standardverfahren anästhesiert. Die Entnahme der Gonaden erfolgte dabei „bedeckt“ über einen präskrotal angelegten Zugang. Intraoperativ wurde auf die Schonung des testikulären Gewebes geachtet.

Die noch in den Hodenhüllen befindlichen Hoden wurden bis zu ihrer sich zeitnah anschließenden Aufarbeitung in 0,1 M Phosphatpuffer aufbewahrt.

3.3 Aufarbeitung der Hoden

In einem ersten Schritt erfolgte die Entfernung der noch vorhandenen Hodenhüllen sowie des Nebenhodens und Samenstranges mittels Skalpellklinge. Anschließend wurde der

Hoden in Längsrichtung gevierteilt und jedes Viertel entsprechend seiner Größe in durchschnittlich zwei bis vier circa 0,1 cm³ bis 1,0 cm³ große Gewebestücke quergeteilt.

3.3.1 Probenaufarbeitung für die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen

3.3.1.1 Fixierung

Um der morphologischen und den unterschiedlichen immunhistochemischen Fragestellungen dieser Arbeit gerecht zu werden, erfuhr jeweils die Hälfte der dafür vorgesehenen Gewebeproben eine Behandlung mit dem Fixans Bouin'sche Lösung bzw. Formol nach Lillie. Ungeachtet einer späteren Möglichkeit der Unterscheidung wurden jeder Fixierlösung gleichermaßen Gewebeproben des rechten und linken Hodens zugeführt.

3.3.1.1.1 Bouin'sche Lösung Die Fixierung der Gewebeproben in Bouin'scher Lösung erfolgte über einen Zeitraum von circa 24 h bei einer Temperatur von 4 °C. In den folgenden drei Tagen wurden die Proben zweimal täglich mit 70 %igem Alkohol gespült und in diesem bei 4 °C gelagert. Bis zum Tag der Einbettung wurde der Spülvorgang im zweitägigen Rhythmus fortgesetzt.

3.3.1.1.2 Formol nach Lillie Die Hodenproben wurden bei einer Temperatur von 4 °C für circa 24 h in Formol nach Lillie fixiert. In den folgenden drei Tagen wurde das Gewebe je zweimal in 0,1 M Phosphatpuffer gespült und darin bei 4 °C aufbewahrt. In den sich wiederum anschließenden drei Tagen erfuhren die Gewebeproben durch zweimaliges Spülen und Lagern in 30, 50 bzw. 70 %igem Alkohol eine schrittweise Dehydrierung. Bis zum Einbetten fanden in zweitägigem Rhythmus zweimalige Spülungen mit 70 %igem Alkohol statt.

3.3.1.2 Einbettung

Nach der Überführung sämtlicher Gewebeproben in Einbettkassetten, erfolgte am Institut für Veterinäranatomie, -Histologie und -Embryologie der Justus-Liebig-Universität, Giessen die weitere Aufarbeitung der Gewebeproben mithilfe des Einbettautomaten so-

wie deren abschließende manuelle Ausformung an einer Paraffinausgießstation.

Bis zu ihrem weiteren Gebrauch wurden die Probenblöcke bei 4 °C gelagert.

3.3.1.3 Schnittpräparation

In Vorbereitung auf die Schnittpräparation wurden die aufgeblockten Gewebeproben auf Eis gelagert. Die Herstellung 2 µm bzw. 3 µm dicker Gewebeschnitte erfolgte anfänglich auf einem Schlittenmikrotom des Institutes für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie der Justus-Liebig-Universität Giessen. Später kam ein klinikeigenes Rotationsmikrotom zur Anwendung; die Schnittdicke lag bei 3 µm.

Sämtliche Schnitte wurden nach ihrer Entfaltung im Paraffin-Streckbad auf Adhäsions-Objektträgern verbracht und bei Raumtemperatur über Nacht oder, im Falle einer Weiterverarbeitung am gleichen Tag, eine Stunde bei 37 °C getrocknet.

3.3.2 Probenaufarbeitung für die molekularbiologischen Untersuchungen

3.3.2.1 Probenkonservierung

Die Fixierung des für die weiteren Untersuchungen verwendeten testikulären Parenchyms erfolgte in RNAlater[®] Tissue Collection: RNA Stabilization Solution. Um die optimale Durchdringung des Gewebes zu gewährleisten, wurde das Parenchym zu Reiskorn-großen Stücken zerkleinert und dann für mindestens 24 h bei 4 °C in dem Fixans belassen. Nach Verpackung von jeweils drei bis vier Parenchymproben pro Aluminiumbriefchen erfolgte deren Lagerung bei -80 °C.

3.3.2.2 Extraktion von Gesamtprotein und RNA

Die Isolierung erfolgte jeweils aus den in RNAlater[®] Tissue Collection: RNA Stabilization Solution fixierten und bei -80 °C aufbewahrten Gewebeproben.

3.3.2.2.1 Gesamtprotein Die Gewebeprobe wurde in eine im Eisbad befindliche sterile Reibeschale gegeben und mithilfe eines sterilen, gefriergeköhlten Pistills unter ständiger Zugabe flüssigen Stickstoffs ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) zerkleinert. Anschließend wurden circa 100 mg des pulverisierten Gewebes in ein 2,0 ml-Reaktionsgefäß abgewogen, mit 0,5 ml eisgeköhltem Protease-Inhibitor-Cocktail versetzt und in diesem dreimal für je 30 s mit einem IKA-ULTRA-TURRAX® T10 basic bei höchster Drehzahl dispergiert. Die Suspension wurde nach Zugabe von 25 mg Sodiumdodecylsulfat (SDS) kurz auf einem Reagenzglasschüttler gemischt und für 10 min in kochendem Wasser denaturiert. Es folgte eine Zentrifugation über 10 min bei 1260,0 g (3500 U/min) und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Schließlich wurde der das Protein enthaltende Überstand in ein neues steriles Reaktionsgefäß überführt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.3.2.2.2 RNA-Extraktion Die in einer Alu-Laborfolie befindlichen tiefgeköhlten Probenstücke wurden mithilfe eines Hammers zu Gewebesplittern zerkleinert und anschließend in eine im Eisbad befindliche und auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgeköhlte, sterile Reibeschale überführt. Die Pulversierung des Gewebes erfolgte mittels eines gefriergeköhlten sterilen Pistills unter Zugabe von flüssigem Stickstoff ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$). Circa 50 mg bis 100 mg des so gewonnenen Gewebepulvers wurden pro RNase-freiem 2,0 ml-Reaktionsgefäß abgewogen und mit 1 ml TRIzol® Reagent versetzt. Die Dispergierung erfolgte unter Anwendung eines IKA-ULTRA-TURRAX® T8. Im Anschluß an eine 10-minütige Inkubation im Eisbad wurde die Suspension mit 200 µl auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ geköhltem Chloroform durchmischt und für 5 min auf Eis gelagert. Die folgende Zentrifugation bei 20159,8 g (14000 U/min) und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ dauerte 15 min und bedingte die Trennung der Suspension in die folgenden Phasen:

- obere farblose wässrige Phase (RNA)
- mittlere weißliche Phase (DNA)
- untere rosa-farbene Phenol- und Chloroform-haltige Phase (DNA und Protein).

Nach Überführung der RNA-haltigen, wässrigen Phase in ein frisches, RNase-freies Plastikgefäß erfolgte eine erneute Aufreinigung mit 200 µl des auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ geköhlten Chloroforms. Wiederum wurde die obere Phase in ein neues RNase-freies Reaktionsgefäß transferiert, wobei gleichzeitig deren Volumen bestimmt wurde. Zur anschließenden Fällung

der RNA wurde der Lösung ein gleicher Volumenanteil von auf -20 °C gekühltem Isopropylalkohol (2-Propanol, Isopropanol) zugegeben und die Probe nach sorgfältigem Durchmischen für 30 min bei -20 °C aufbewahrt. Es folgte eine kurze Resuspension des Niederschlages, bevor die Probe bei 4 °C und 20159,8 g (14000 U/min) für 10 min abzentrifugiert wurde. Nach Entfernung des Überstandes wurden dem gebildeten Gel-artigen Pellet 500 µl eisgekühlten, 70 %igen Ethanol zugegeben, die Probe für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 4 °C und 20159,8 g (14000 U/min) über 10 min abzentrifugiert. Nachdem der resultierende RNA-haltige Niederschlag einem weiteren Waschvorgang mit dem eisgekühlten Ethanol unterzogen worden war, erfolgte das circa 15-minütige Antrocknen des Pellet bei 37 °C im Wärmeschrank. Abschließend wurde das RNA-Pellet in 50 µl autoklaviertem Aqua bidest gelöst, wozu die Probe für 10 min in ein 70 °C warmes Schüttelwasserbad verbracht wurde. Zuletzt erfolgte die Zugabe von 1 U RNase-Inhibitor pro µl RNA-Suspension. Bis zu ihrer weiteren Verwendung wurde die RNA bei einer Temperatur von -80 °C gelagert.

3.3.2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Alle im Rahmen dieser Untersuchung durchgeführten photometrischen Messungen erfolgten mithilfe des Eppendorf® BioPhotometer® unter Verwendung der rechteckigen UVette® Einwegküvetten.

3.3.2.3.1 Gesamtprotein Die Konzentrationsbestimmung (µg/ml) des Gesamtproteins wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm durchgeführt. Hierzu erfolgte eine Verdünnung der zu analysierenden Proteinlösung im Verhältnis 1:10 mit einem Protease-Inhibitor-Cocktail, welcher auch zur Erstellung des Leerwertes herangezogen wurde.

3.3.2.3.2 RNA Die Konzentration (µg/ml) der Gesamt-RNA wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Dazu wurde die Ausgangslösung mit autoklaviertem Aqua bidest 1:100 verdünnt. Als Leerwert diente autoklaviertes Aqua bidest.

3.3.2.4 Herstellung einer Arbeitsverdünnung

3.3.2.4.1 Gesamtprotein Basierend auf der photometrischen Konzentrationsbestimmung erfolgte unter Verwendung des Protease-Inhibitor-Cocktails die Herstellung einer 10 µg Gesamtprotein/µl-haltigen Arbeitsverdünnung.

3.3.2.4.2 RNA Den photometrischen Messwerten entsprechend wurde jede Probe mit autoklaviertem Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser auf eine Konzentration von 0,2 µg Gesamt-RNA/µl eingestellt.

Die Lagerung der Gesamtprotein- bzw. RNA-Arbeitsverdünnungen erfolgte bei -20 °C.

3.4 Histologische Untersuchung

3.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung erfolgte im Rahmen der histo-morphologischen Beurteilung der Hoden. Pro Hund wurden mindestens drei Bouin-fixierte Schnitte angefärbt, welche in der Regel von unterschiedlichen Probenblöcken stammten. Die zweimalige Verwendung eines Paraffinblockes zur Schnittherstellung stellte eine Ausnahme dar, bei welcher ein Mindestabstand von 30 µm zwischen den Schnitten eingehalten wurde.

In einem ersten Schritt wurden die Schnitte zweimal für je 10 min in Xylol deparaffiniert. Für die sich anschließende Rehydrierung wurden die Proben in einer absteigenden Alkoholreihe je 5 min in 95, 80, 70, 60 und 50 %igem Ethanol und schließlich in Aqua bidest gebadet. Die Proben wurden 10 min in einer wässrigen Hämatoxylin-Lösung (1:1) gefärbt und anschließend für weitere 10 min unter fließendem Leitungswasser „gebläut“. Nun folgte eine 5 min andauernde Färbung mit Eosin-Lösung. Nach einem kurzen Spülen in Leitungswasser wurden die Gewebeschnitte zum weiteren Entfärben für einen kurzen Moment in 80 %igen und anschließend in 95 %igen Alkohol überführt. Nach einem zweimaligen je 2,5 min andauernden Bad in absolutem Alkohol wurden die Schnitte schließlich in zwei aufeinander folgenden 10-minütigen Xylolbädern vollständig dehydriert. Abschließend er-

folgte die dauerhafte Fixierung der Gewebeproben mit dem wasserfreien Eindeckmedium Assistent-Histokitt unter einem Deckglas.

3.4.1.1 Auswertung

Sowohl die Bewertung als auch eine exemplarische Dokumentation der histologischen Ergebnisse erfolgten bei 400-facher Vergrößerung unter Verwendung des Durchlichtmikroskops Leitz DMRM mit integrierter Digitalkamera Leica DC300.

Pro Hund wurden zweimalig die Querschnitte von 200 intakten, annähernd runden Tubuli seminiferi contorti beurteilt. Eine Ausnahme hiervon bildeten die Tiere der Versuchsgruppe „juvenil“, bei welchen lediglich 100 Samenkanälchen evaluiert wurden. In die Untersuchungen flossen alle im Keimepithel befindlichen Zellen ein, lose im Tubulolumen vorkommende Keimzellen blieben unberücksichtigt.

Die zur Erfassung der gewünschten 200 Tubuli seminiferi contorti pro Hund benötigte Anzahl an Schnittpräparationen wies mit eins bis mehr als zehn eine hohe Variabilität auf. Eine Überprüfung der Validität der Stichprobengröße schien daher unerlässlich und es erfolgte eine nachträgliche Visualisierung von je drei Schnittpräparationen pro untersuchtem Rüden. Dabei zeigte sich eine weitgehende morphologische Übereinstimmung der Schnitte eines jeden Tieres.

- Versuchsgruppe „Gonazon®“

Ziel der Auswertung war die Zuordnung der Rüden zu definierten Entwicklungsstadien der Rekrudescenz der Spermatogenese. Nach einem ersten Screening zeigte sich, dass eine Orientierung anhand der Kastrationszeitpunkte nicht möglich war, sodass das jeweils am weitesten entwickelten Keimzellstadium als Kriterium herangezogen wurde. Dabei ergab sich die Bildung der Developmental Group (DG) A, DG B, DG C und DG D (siehe Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: Klassifizierung nach Developmental Group (DG) A bis DG D

DG	am weitesten entwickeltes Keimzellstadium
A	Spermatozyten (Spz)
B	Spermatiden rund (rSpt)
C	Spermatiden elongierend (eldSpt)
D	Spermatiden elongiert (eltSpt)

Zur weiteren Eingrenzung des Entwicklungsstandes erfolgte darüber hinausgehend bei jedem Tier der DG A bis DG C eine Klassifizierung der Tubuli seminiferi contorti. Dabei bestimmte ebenfalls die am weitesten entwickelte Keimzelle eines Tubulus dessen Zugehörigkeit zu einem bestimmten Tubulustyp (tt) gemäß Tabelle 3.4.

Tabelle 3.4: Klassifizierung nach Tubulustyp (tt) a bis tt d₂

tt	am weitesten entwickeltes Keimzellstadium
a	Spermatogonien (Spg)
b	Spermatozyten (Spz)
c ₁₋₃	Spermatiden rund (rSpt)
c ₁	- ohne akrosomalem Bläschen
c ₂	- mit akrosomalem Bläschen
c ₃	- mit akrosomaler Kappe
d ₁₋₂	Spermatiden elongierend (eldSpt)
d ₁	- ovaler Zellkern
d ₂	- gestreckter Zellkern

Bei Hunden mit vollständig abgeschlossener Spermatogenese (DG D) orientierte sich die Zuordnung der Tubuli seminiferi contorti an dem von RUSSELL et al. (1990b) beschriebenen, acht Stages (SI bis SVIII) umfassenden Schema des caninen Keimepithelzyklus

(siehe Abbildung 2.1, Seite 18). Abweichend davon unterblieb im Rahmen der vorliegenden Untersuchung jedoch die Unterscheidung der Stages (S) II bis SIV.

Die Identifizierung des Stage erfolgte sowohl nach der Gesamtansicht des tubulären Keimzellbildes als auch einer eingehenden Beurteilung eines jeden vorhandenen Zelltyps, besonders aber der Spermatiden. Ausschließlich die dem tubulären Keimepithel aufsitzenden, in direkter Erwartung der Spermiation befindlichen Spermatiden wurden als „vollständig elongiert“ angesprochen. Tubuli seminiferi contorti, deren Keimepithel sich im Übergang zweier Stages befand, wurden entweder dem nach subjektiver Einschätzung quantitativ stärker vertretenen oder, bei identischer Häufung, dem fortgeschritteneren Stage zugeordnet. Vereinzelt fanden sich auch bei den Tieren mit vollständiger Spermatogenese Tubuli seminiferi contorti, welche aufgrund ihrer verzögerten Entwicklung den Tubulustypen (tt) der DG A bis DG C zugeordnet werden konnten.

- Versuchsgruppe „Kontrolle adult“

Die Auswertung erfolgte wie bereits für die Versuchsgruppe „Gonazon®“ DG D beschrieben. Vereinzelt vorkommende, in ihrer Entwicklung verzögerte Tubuli seminiferi contorti wurden entsprechend der DG A bis DG C nach Tubulustypen (tt) kategorisiert.

- Versuchsgruppe „Profact®“

Die Bewertung des Keimepithels der Tubuli seminiferi contorti der Versuchsgruppe „Profact®“ wurde gemäß den für die Versuchsgruppe „Gonazon®“ DG A bis DG C beschriebenen Kriterien durchgeführt.

- Versuchsgruppe „juvenil“

Unter Berücksichtigung des juvenilen Entwicklungsstandes der Keimzellen erfolgte lediglich eine deskriptive Beschreibung des Keimepithels.

3.5 Western Blot

Der Western Blot ermöglichte die Überprüfung der Spezifität der in der Immunhistochemie verwendeten Antikörper. Nach der Auftrennung der Probenproteine mittels Sodium-

dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) erfolgte die Übertragung der nach Größe und Molekulargewicht getrennten Proteine auf eine Blotting-Membran, wo sich nach Inkubation mit dem jeweiligen Antikörper dessen proteinspezifische Detektion im Rahmen einer indirekten immunhistochemischen Farbreaktion anschloss.

3.5.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Bei der Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) handelt es sich um ein bereits von LAEMMLI (1970) angewandtes Verfahren der denaturierenden diskontinuierlichen Elektrophorese. Die Besonderheit dieser Methode besteht in der Kombination des sich in Porengröße und pH-Wert unterscheidenden SDS-Sammel- und PA-Trenngels.

Die Herstellung des aus Sammel- und Trenngel bestehenden $100,0 \times 105,0 \times 0,75 \text{ mm}^3$ starken Elektrophoresegels erfolgte mithilfe der Gießvorrichtung Mighty Small SE245 DUAL GEL CASTER. Vorbereitend mussten alle Einzelteile der Apparatur vollständig mit Alkohol entfettet und den Herstellerangaben folgend zusammengesetzt werden.

In einem ersten Schritt wurde das Trenngel wie in Tabelle 3.5 beschrieben vorbereitet.

Tabelle 3.5: Zusammensetzung des Trenngels (7,5 %) zur SDS-PAGE

Komponente (Konzentration)	Volumen (μl)/Gel	
Acrylamid-Stammlösung (30 %)	1875	
Trenngelpuffer (1,5 M)	2813	
Aqua bidest	2672	\Rightarrow 3-minütige Entgasung
SDS-Stammlösung (10 %)	75	
APS ¹⁾ -Lösung (10 %)	60	
TEMED ²⁾ (99 %)	6	
Acrylamid-Trenngel (7,5 %)	7501	

¹⁾ Ammoniumperoxodisulfat

²⁾ N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin

Unter Vermeidung von Lufteinschlüssen erfolgte die zügige Befüllung der Gelkammer mit

dem noch flüssigen, entgasten 7,5 %igen Acrylamid-Trenngel, sowie dessen Überschichtung mit 1 ml Isopropanol. Gegen Ende der 45-minütigen Polymerisation des Trenngels wurde das 5 %ige Acrylamid-Sammelgel vorbereitet (siehe Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6: Zusammensetzung des Sammelgels (5 %) zur SDS-PAGE

Komponente (Konzentration)	Volumen (µl)/Gel
Acrylamid-Stammlösung (30 %)	417
Sammelgelpuffer (0,5 M)	313
Aqua bidest	1731
SDS-Stammlösung (10 %)	25
APS-Lösung (10 %)	13
TEMED (99 %)	3
Acrylamid-Sammelgel (5 %)	2502

Nach abgeschlossener Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol abgegossen und durch Nachspülen mit Aqua bidest vollständig entfernt. Um eine Verbindung zwischen Trenngel und Sammelgel zu gewährleisten, mussten die auf dem Trenngel befindliche Flüssigkeitsreste mithilfe eines Filterpapiers beseitigt werden. Die Grenze zwischen den beiden Gelen wurde auf der Gelkammer markiert. Nachdem die Gelkassette mit der 5 %igen Acrylamid-Sammelgel-Lösung aufgefüllt worden war, wurde unter Vermeidung eines Lufteintrages ein Probenkamm zur Ausbildung der Probetaschen in dem noch flüssigen Sammelgel platziert.

Während der 30-minütigen Polymerisation des Sammelgels fand die Vorbereitung der Proteinproben statt. Nachdem die Arbeitsverdünnungen (siehe Kapitel 3.3.2.4.1) auf Eis aufgetaut worden waren, erfolgte die Herstellung der aus circa 120 µg (100-150 µg) Gesamtprotein und 3x Probenauftragspuffer im Verhältnis von 3:1 Volumenanteilen bestehenden Proben. Alle Proben wurden nun in 95 °C heißem Wasser für 3 min hitzedenaturiert, anschließend in Eiswasser abgeschreckt und in diesem bis zur weiteren Verwendung gelagert. Nach Polymerisation des Sammelgels wurde der Platzhalterkamm vorsichtig entfernt und die entstandenen Probetaschen mit dem 1x Elektrodenpuffer gespült. Nach dem Einspannen der Gel-Kassette in die vertikale Elektrophoresekammer Mighty Small II SE250/260,

erfolgte die Befüllung der Probetaschen sowie der Elektrophoresekammer mit dem auf 4 °C gekühlten 1xElektrodenpuffer. Schließlich wurden entsprechend der in Tabelle 3.7 beschriebenen Reihenfolge sowohl die Proben als auch die beiden verwendeten unverdünnten Molekülmassestandards (Prestained Molecular Weight Standard Mixture SDS-7B, 31,5-172,0 kDa; PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10,0-170,0 kDa) durch den 1xElektrodenpuffer hindurch auf den Boden der Probetaschen pipettiert.

Tabelle 3.7: Belegung der Probetaschen für die Gelelektrophorese

Probetasche 1	1xElektrodenpuffer
Probetasche 2	Prestained Molecular Weight Standard Mixture SDS-7B
Probetasche 3	Proteingemisch Testis Maus
Probetasche 4	Proteingemisch Testis Hund „Tom“
Probetasche 5	PageRuler™ Prestained Protein Ladder
Probetasche 6	Prestained Molecular Weight Standard Mixture SDS-7B
Probetasche 7	Proteingemisch Testis Maus
Probetasche 8	Proteingemisch Testis Hund „Tom“
Probetasche 9	PageRuler™ Prestained Protein Ladder
Probetasche 10	1xElektrodenpuffer

Nach dem Verschluss der Elektrophoresekammer wurde mit der Elektrophorese unter Durchflusskühlung mittels Tauchzirkulator begonnen. Das anfänglich angelegte Stromfeld besaß eine Stärke von 15 mA sowie eine maximale Spannung von 300 V und wurde durch das Netzgerät Electrophoresis Power Supply - EPS 301 erzeugt. Mit dem durch die Bromphenolblau-Bande des Probenauftragspuffers gekennzeichneten Eintritt des Proteingemischs in das Trenngel erfolgte die Erhöhung der Stromstärke auf 25 mA. Die Gesamtlaufzeit betrug circa 70 min, wobei die eigentliche Auftrennung der im Trenngel vorhandenen Proteingemische circa 50 min bedurfte. Nach Annäherung der Bromphenolblau-Bande an den den Probetaschen gegenüberliegenden Seitenrand des Gels wurde die Elektrophorese beendet.

3.5.2 Western Blot

Die Durchführung des eigentlichen Western Blots mit anschließender Ponceau-S-Färbung erfolgte im direkten Anschluß an die Gelelektrophorese und diente einer dauerhaften Fixierung der Proteine auf einer Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran.

Vorbereitend wurde die PVDF-Membran nach dem Zurechtschneiden kurz mit Methanol benetzt und anschließend, gemeinsam mit den für das Blot-Sandwich benötigten Filterkartons und Schwammtüchern, für 20 min in Transferpuffer äquilibriert. Des Weiteren musste auch das Elektrophoresegel der Gelkassette entnommen und für 10 min in Transferpuffer gespült werden. Nun erfolgte der luftblasenfreie Zusammenbau des Blot-Sandwiches mit der innenliegenden, beidseits durch Filterkartons geschützten Gel-Transfermembran-Kombination sowie den äußerlich befindlichen Schwammtüchern. Die Ausrichtung der Gel-Transfermembran-Kombination entsprach der Fließrichtung der Proteine in einem elektrischen Feld, d.h. das Gel war der Kathode, die Membran der Anode zugewandt. Entsprechend wurde nun das Blot-Sandwich in die mit Kühleinheit ausgestattete Blot-Apparatur Mini Trans-Blot® Cell überführt, welche mit Transferpuffer befüllt war. Ein Magnetrührer sicherte die gleichmäßige Durchmischung und Kühlung des Transferpuffers. Die Proteinübertragung erfolgte bei einer Spannung von 100 V und einer maximalen Stromstärke von 300 mA innerhalb von 67 min. Anschließend wurde die Transfermembran dem Blot-Sandwich entnommen und bei Raumtemperatur mindestens 30 min vollständig getrocknet.

3.5.3 Ponceau-S-Färbung

Mithilfe der Ponceau-S-Färbung erfolgte eine unspezifische Anfärbung sämtlicher auf die PVDF-Membran transferierter Proteine, sodass die Effizienz des Blotvorgangs beurteilt werden konnte.

Für die Färbung wurde die getrocknete Transfermembran kurz mit Methanol benetzt, für 3 min in eine im Verhältnis 1:10 verdünnte Ponceau-S-Arbeitslösung überführt und abschließend kurz mit Aqua bidest gespült. Nach einer fotografischen Ergebnisdokumentation wurde die Transfermembran in 1x PBS-Puffer entfärbt. Es schloss sich die Immun-

detektion an.

3.5.4 Immundetektion des Androgenrezeptors

Die Immundetektion des Androgenrezeptors (AR) erfolgte mithilfe eines vom Kaninchen stammenden polyklonalen Antikörpers „AR (N-20): sc-816“ (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), welcher in einer Konzentration von $1,0 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Anwendung fand. Nach Herstellerangaben detektiert der Antikörper spezifisch den Androgenrezeptor von Mensch und Maus. Als Negativkontrolle diente der Magermilchpulver enthaltende Blocking-Puffer.

Im Anschluß an die Ponceau-S-Färbung wurde die entfärbte PVDF-Membran für 15 h in einen auf 4°C gekühlten Blockierungspuffer überführt, um mögliche unspezifische Bindungsstellen für Antikörper abzusättigen. Nach einem kurzen Spülen in PBST-Puffer erfolgte eine zusätzliche Reduzierung möglicher Hintergrundfärbung durch das Blocken unspezifischer Bindungsstellen einzelner Komponenten des Avidin-Biotin-Complex (ABC)-Systems bei Raumtemperatur. Hierzu wurde in einem ersten Schritt die Transfermembran für eine Stunde mit einer in PBS-Puffer verdünnten Avidin D-Lösung (6 Tropfen Avidin D-Lösung pro 14 ml PBS-Puffer) und, nach einem kurzen Spülen in PBST-Puffer, für 30 min in eine ebenfalls in PBS-Puffer verdünnten Biotin-Lösung (6 Tropfen Biotin-Lösung pro 14 ml PBS-Puffer) inkubiert. Es folgte erneut ein kurzes Spülen der PVDF-Membran in PBST-Puffer, bevor diese in zwei mit dem gleichen Proteinauftrag bestückte Hälften geteilt wurde.

Die Behandlung der beiden Membranhälften erfolgte von nun an getrennt. Während der eine Teil dem in Blockierungspuffer befindlichen Primärantikörper in einer zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur zugeführt wurde, befand sich der andere in dem als Kontrollserum verwendeten Blockierungspuffer. Dem dreimaligen, je 5 min andauernden Spülen in PBST-Puffer schloss sich die einstündige Inkubation der Membranen mit dem in Blockierungspuffer gelösten biotinylierten Ziegen-anti-Kaninchen-Sekundärantikörper (Vectastain® ABC-Kit, Elite PK-6101 RABBIT IgG; 1 μl Sekundärantikörper pro 1 ml Blockierungspuffer) bei Raumtemperatur an. Nachdem noch ungebundene, auf den PVDF-Membranhälften befindliche Sekundärantikörper durch dreimaliges je 5-minütiges Spülen

in PBST-Puffer entfernt worden waren, erfolgte bei Raumtemperatur die 30-minütige Inkubation mit dem Signal-verstärkenden Peroxidase-konjugierten ABC-System. Dieses war zuvor in PBS-Puffer entsprechend der Herstellerangabe gelöst worden. Durch dreimaliges je 5 min andauerndes Spülen wurden überschüssige Komponenten des ABC-Systems entfernt. Die Visualisierung der detektierten Proteinen erfolgte mithilfe des Chromogens Vector® *NovaRED*TM SUBSTRATE KIT FOR PEROXIDASE (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA) unter leichtem Schwenken der PVDF-Membranen. Die Farb-reaktion wurde nach 5-minütiger Sichtkontrolle durch gründliches Spülen der Membranen mit Aqua bidest gestoppt. Im Anschluss an die vollständige Lufttrocknung der PVDF-Membranhälften erfolgte eine fotografische Ergebnisdokumentation mittels digitaler Kompaktkamera.

3.6 Immunhistochemische Untersuchungen

Die immunhistochemische Färbung der Gewebe erfolgte mit der indirekten (Zwei-Schritt-) Methode, in welcher der an das Antigen spezifisch gebundene mono- oder polyklonale Erstantikörper mithilfe eines markierten Sekundärantikörpers detektiert wird. Sowohl die Wahl des Markers als auch die des zur Visualisierung angewandten Chromogens richtete sich nach den experimentellen Erfordernissen der Einfach- oder Doppelfärbung.

Die Lagerung sämtlicher immunhistochemisch gefärbter Präparate erfolgte abgedunkelt in Präparatekästen bei 4 °C.

Zur Gewährleistung einer möglichst einheitlichen Beurteilung sowohl der objektiv als auch der subjektiv zu erfassenden Parameter oblag die Auswertung ausschließlich einer Person (Verfasserin der Dissertation).

Eine fotografische Dokumentation der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte vollständig für die Antigene AR, Ki-67 und Vimentin (Vim)/AR, sowie exemplarisch für die aktivierte Caspase-3 unter Zuhilfenahme der dem Durchlichtmikroskop Leitz DMRM angeschlossenen Digitalkamera Leica DC300.

3.6.1 Einfachfärbung

Bei allen durchgeführten immunhistochemischen Einfachfärbungen kam die Avidin-Biotin-Complex (ABC)-Methode zur Anwendung. Hierzu erfolgt in einem ersten Schritt die Detektion des an die spezifischen Epitope gebundenen Primärantikörpers mithilfe eines biotinylierten Zweitantikörpers. Die sich anschließende ABC-Methode nutzt nun die hohe Affinität des Biotins für Avidin, um eine Signal-verstärkende Verbindung zwischen dem Zweitantikörper und einer Vielzahl an Avidin-Biotin-Meerrettichperoxidase-Komplexen aufzubauen. Sowohl die Meerrettichperoxidase als auch in geringerem Maße der enzymatische Cofaktor Biotin ermöglichen die Visualisierung der Antigen-Antikörper-Reaktion, indem sie nach Zugabe des Substrates Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Bildung eines Peroxidations (O_2^{2-}) die Oxidation des Chromogens 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) zu einem bräunlichen und die des Chromogens 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) zu einem rötlichen Farbstoff katalysieren.

Den angewandten Methoden lag eine weitgehend einheitliche Vorgehensweise zugrunde. Sämtliche Abweichungen dienten der Optimierung des Reaktionsablaufes in Abhängigkeit vom Primärantikörper.

3.6.1.1 Androgenrezeptor (AR)

3.6.1.1.1 Immunhistochemische Darstellung Wie bereits beim Western Blot handelte es sich bei dem zur Immundetektion des AR verwendeten Primärantikörper um den vom Kaninchen stammenden polyklonalen Antikörper „AR (N-20): sc-816“ (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Dieser wurde in einer Konzentration $2,0 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingesetzt. Als Negativkontrolle diente das in gleicher Konzentration eingesetzte „Rabbit IgG“ der Firma Vector Laboratories.

Die Detektion des AR erfolgte an Bouin-fixierten Gewebeproben. Pro Tier wurden in Abhängigkeit der Hodengröße ein bis vier Schnitte mit dem AR-Antikörper inkubiert. Die Durchführung der Negativkontrolle verlief exemplarisch anhand je einer willkürlich gewählten Gewebeprobe pro Developmental Group der Versuchsgruppe „Gonazon®“ sowie

den übrigen Versuchsgruppen „Kontrolle adult“, „Profact®“ und „juvenil“.

In einem ersten Schritt wurden die Schnitte zweimal für je 10 min in Xylol deparaffiniert. Es folgte deren je 5-minütige Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe aus 100, 95 und 70 %igem Ethanol mit abschließendem Wässern in Aqua bidest.

Zur Vorbereitung auf das Hitze-induzierte Antigen-Retrieval wurden die Proben 5 min in Citratpuffer gespült und anschließend in einen bereits bei 560 W im Mikrowellengerät erwärmten Citratpuffer überführt.

Es folgte das dreimalige, je 5-minütige Kochen der Proben in einem Mikrowellengerät bei 560 W. Das während des wiederholten Erhitzens verdunstete Flüssigkeitsvolumen wurde zwischen den einzelnen Kochschritten durch Citratpuffer ersetzt.

Anschließend kühlten die im warmen Puffer verbliebenen Gewebeschnitte für 20 min bei Raumtemperatur ab, bevor sie in den eigentlichen Tris-HCl-Puffer überführt und darin 5 min gewaschen wurden.

Zur Vermeidung möglicher unspezifischer Farbumsetzungen erfolgte das Blocken der endogenen Peroxidaseaktivität in einem abgedunkelten, 30-minütigen 3 %igen Wasserstoffperoxid-Methanol-Bad.

Danach wurden die Schnitte erneut in Tris-HCl-Puffer gegeben und dreimal für je 5 min gewaschen.

Nun wurden die Objektträger einzeln dem Waschpuffer entnommen und die anhaftende Flüssigkeit mithilfe von Präzisionswischtüchern entfernt, wobei ein Austrocknen der Gewebeschnitte sicher vermieden wurde. Die Gewebeschnitte wurden mit dem Dako Pen umfahren, sodass eine Auftragsfläche für die nachfolgenden Inkubationslösungen geschaffen wurde, und mit dem Blockierungsserum überschichtet.

Die sich anschließende 30-minütige Inkubation der Proben mit einem Blockierungsserum (Normalserum) erfolgte in einer feuchten Kammer und diente der Sättigung eventuell vorhandener, gewebeeigener Bindungsstellen für den Zweitantikörper. Das Blockierungsserum bestand aus einer auf 1x PBS-Puffer basierenden 1,43 %igen Bovines Serumalbumin (BSA)-Lösung (1,43 % BSA-1x PBS-Puffer) mit 0,03 % Triton X-100, in welche das Ziegenserum (Vectastain® ABC-Kit, Elite PK-6101 RABBIT IgG) entsprechend den Herstellerangaben eingemischt worden war.

Die Inkubation der mit dem Erstantikörper bzw. dem Kontrollserum überschichteten Gewebeschnitte erfolgte in einer feuchten Kammer bei 4 °C über einen Zeitraum von 20 h. Sowohl der Primärantikörper als auch das Kontrollserum waren hierzu mit Tris-HCl-Puffer auf eine Proteinkonzentration von $2 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt worden.

Ein Überschuß an Primärantikörper und Kontrollserum wurde nach Ablauf der Inkubation durch dreimaliges, je 5-minütiges Waschen in Tris-HCl-Puffer von den Schnitten entfernt. Als Zweitantikörper diente ein biotinylierter Ziege-anti-Kaninchen IgG Antikörper (Vectastain® ABC-Kit, Elite PK-6101 RABBIT IgG), welcher in Blockierungsserum nach Herstellerangaben verdünnt worden war. Die Schnitte wurden mit der Zweitantikörper-Lösung überschichtet und für 50 min in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Das Entfernen noch ungebundener Zweitantikörper erfolgte wiederum durch zweimaliges, je 5-minütiges und schließlich einmaliges 15-minütiges Waschen in Tris-HCl-Puffer.

Anschließend wurden die Schnitte in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 47 min mit dem Signal-verstärkenden Peroxidase-konjugierten Avidin-Biotin-Komplex (Vectastain® ABC-Kit, Elite PK-6101 RABBIT IgG) überschichtet. Dieser war in Tris-HCl-Puffer den Herstellerangaben entsprechend vorbereitet worden.

Durch dreimaliges, je 5-minütiges Waschen in Tris-HCl-Puffer wurden die Proben erneut von überschüssigen, freien Avidin-Biotin-Komplexen befreit.

Die sich anschließende 30-minütige Inkubation der Gewebe erfolgte bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer mit dem nach Herstellerangaben in Tris-HCl-Puffer gelösten Farbsubstrat 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol (AEC, AEC SUBSTRATE KIT FOR PEROXIDASE SK4200) und diente der Visualisierung der stattgefundenen Antigen-Antikörper-Reaktion.

Das 5-minütige Spülen der Schnitte in fließendem Leitungswasser beendete die ablaufende Substratreaktion.

Die nachfolgende Gegenfärbung der Gewebe in einer wässrigen Hämatoxylin-Lösung (1:1) mit anschließendem 5-minütigem „Bläuen“ unter fließendem Leitungswasser diente der erleichterten Identifizierung morphologischer Strukturen.

Abschließend wurden die Proben mithilfe von Kaisers Glyceringelatine unter Deckglas konserviert.

3.6.1.1.2 Auswertung Zur mikroskopischen Auswertung stand das bereits beschriebene, mit der Digitalkamera Leica DC300 versehene Durchlichtmikroskop Leitz DMRM zur Verfügung. Nach der Überprüfung der Negativkontrollen wurden pro Tier 20 Tubuli seminiferi contorti meanderförmig aufgesucht und in einer 400-fachen Vergrößerung beurteilt. Die fotografische Dokumentation der Tubuli seminiferi contorti inklusive intratubulärer Zellen erfolgte bei einer 200-fachen Vergrößerung.

In einem ersten Schritt wurde, wie in Kapitel 3.4.1.1 für die DG A bis DG C und die DG D beschrieben, die morphologische Klassifizierung eines jeden Tubulus seminiferus contortus vorgenommen. Anschließend erfolgte mithilfe des Programms Leica Image Manager IM1000 die Vermessung des kleinsten und größten rechtwinklig zueinander liegenden Durchmessers (d_1 , d_2) pro Tubulus seminiferus contortus (vgl. Abbildung 3.2).

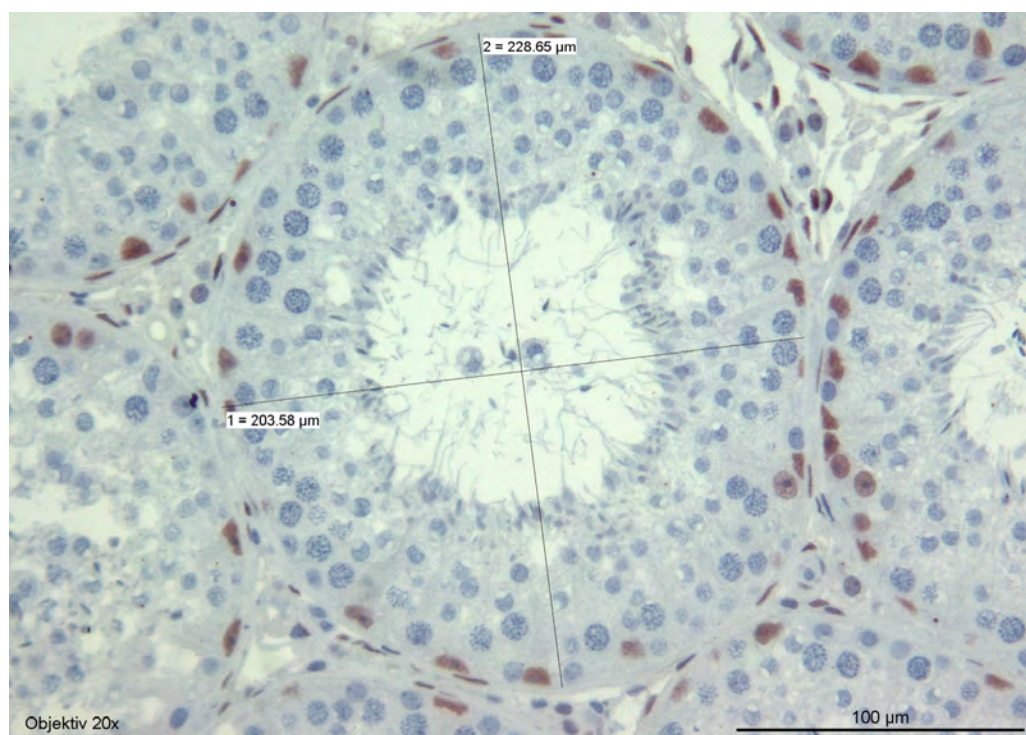


Abbildung 3.2: Vermessung eines Tubulus seminiferus contortus zur Feststellung des tubulären Flächeninhaltes

Zur Berechnung des Flächeninhaltes eines tubulären Querschnittes fand die nachfolgende Formel Anwendung:

$$A = \pi \frac{d_1}{2} \frac{d_2}{2} = \pi \frac{d_1 d_2}{4}.$$

Anschließend wurde pro Tubulus seminiferus contortus die Anzahl AR-positiver und -negativer Sertolizellen (SZ) sowie deren Lokalisation zur Basalmembran festgestellt. Außerdem erfolgte die subjektive Beurteilung und Zuordnung der Gesamtheit der in einem Tubulus seminiferus contortus befindlichen AR-positiven SZ zu den in Abbildung 3.3 dargestellten Färbeintensitäten FI0 (fehlende), FI(1) (schwache), FI1 (mittlere) und FI2 (starke Anfärbung).

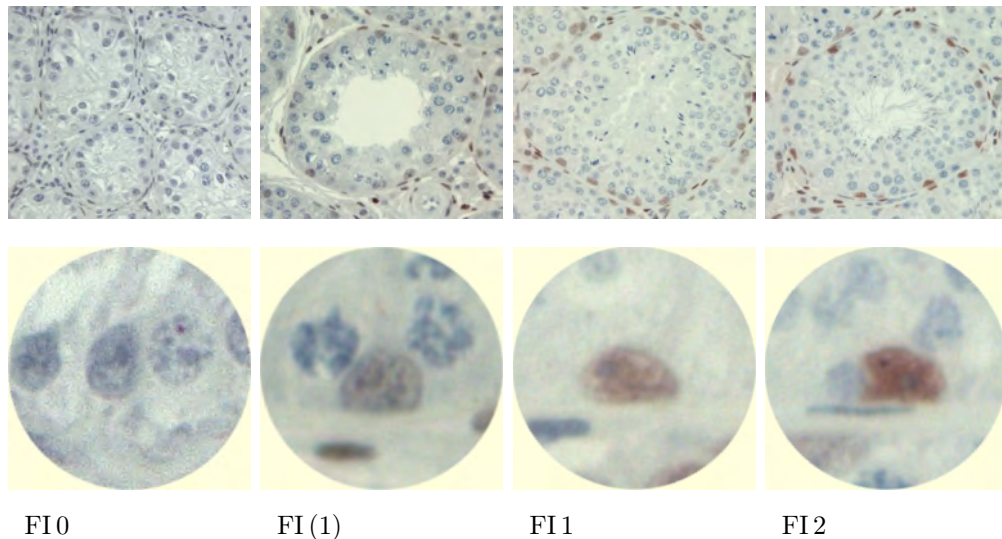


Abbildung 3.3: Färbeintensitäten (FI) der Sertolizellen (200 x; Ausschnitt);
 [FI0 (fehlende)/ FI(1) (schwache)/ FI1 (mittlere)/ FI2 (starke Anfärbbarkeit)]

Entsprechend erfolgte die quantitative Erfassung der Spermatogonien sowie deren Zuordnung zu den in Abbildung 3.4 gezeigten Färbeintensitäten FI0 bis FI2.

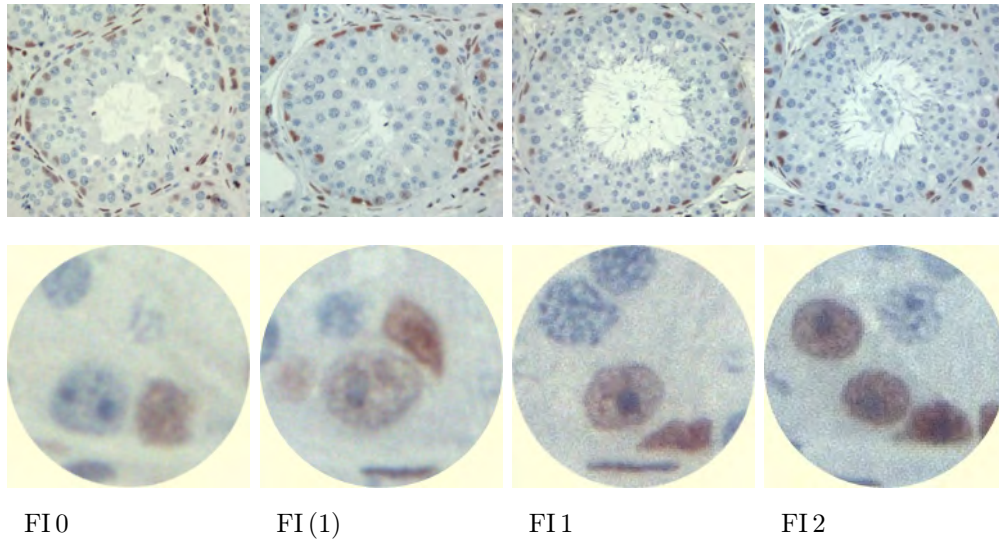


Abbildung 3.4: Färbintensitäten (FI) der Spermatogonien (200 x; Ausschnitt);
[FI0 (fehlende)/ FI(1) (schwache)/ FI1 (mittlere)/ FI2 (starke Anfärbbarkeit)]

Die Auswertung und Dokumentation der intertubulären Leydigzellen (LZ) erfolgte ebenfalls bei einer 400-fachen Vergrößerung. Hierzu wurden meanderförmig Gesichtsfelder aufgesucht, die mindestens drei sicher zu identifizierende LZ aufwiesen.

Insgesamt wurden 100 LZ pro Tier einer einzelnen Bewertung ihrer Färbintensität FI0 bis FI2 entsprechend der Abbildung 3.5 unterzogen.

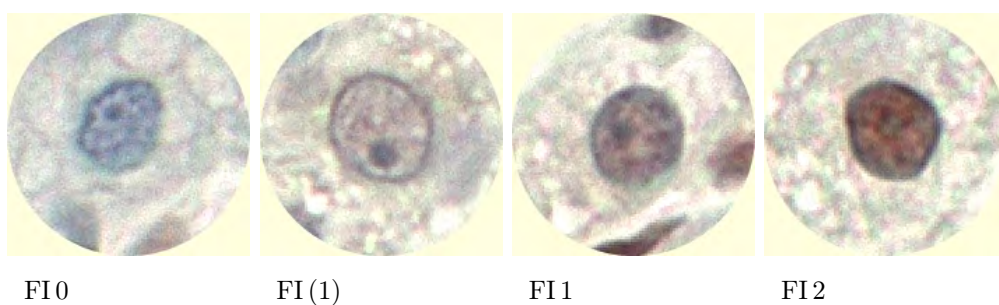


Abbildung 3.5: Färbintensitäten (FI) der Leydigzellen (Ausschnitt);
[FI0 (fehlende)/ FI(1) (schwache)/ FI1 (mittlere)/ FI2 (starke Anfärbbarkeit)]

Anzumerken ist, dass für sämtliche Auswertungen ausschließlich sicher identifizierbare Zellen herangezogen wurden.

3.6.1.2 Proliferationsmarker Ki-67

3.6.1.2.1 Immunhistochemische Darstellung Der Nachweis des Proliferationsmarkers Ki-67 wurde mithilfe des „Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen, Clone MIB-1“ (Dako Denmark A/S, Denmark) erbracht. Die Isotypenkontrolle erfolgte mit dem „Mouse IgG₁ Ab-1 (Clone NCG01)“ der Firma DIANOVA GmbH, Hamburg. Beide fanden in einer Proteinkonzentration von $1,6 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Anwendung.

Für die immunhistochemische Darstellung des Ki-67 Antigens wurden pro Hund ein bis vier Bouin-fixierte Schnittpräparationen verwendet. Die Negativkontrollen erfolgten exemplarisch an je einem Schnitt eines willkürlich gewählten Tieres der DG A bis DG D der Versuchsgruppe „Gonazon®“ sowie den Versuchsgruppen „Kontrolle adult“, „Profact®“ und „juvenil“. Als Positivkontrolle war vom Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Giessen freundlicherweise das in Formol nach Lillie fixierte Darmgewebe eines Hundes zur Verfügung gestellt worden.

Das Vorgehen bei der immunhistologischen Färbung des Ki-67 Antigens entsprach weitgehend dem zur Darstellung des Androgenrezeptors, sodass im Folgenden lediglich die Abweichungen von dem in Kapitel 3.6.1.1.1 beschriebenen Protokoll dargelegt werden.

- Das Antigen-Retrieval erfolgte durch eine fünfmalige Behandlung im Mikrowellenofen bei 800 W.
- Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde eine 10 %ige Pferdeserum-Tris-HCl-Puffer-Lösung verwendet.
- Die Inkubation mit dem in Tris-HCl-Puffer verdünnten Primärantikörper bzw. der Isotypenkontrolle dauerte 22 h.
- Bei dem Sekundärantikörper handelte es sich um den biotinylierten Pferd Anti-Maus Antikörper BA 2000 (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA), welcher im Verhältnis 1:200 in Tris-HCl-Puffer verdünnt worden war. Die Inkubation erfolgte über 1 h. Ungebundener Zweitantikörper wurde durch dreimaliges, je 5-minütiges Spülen entfernt.

- Die Inkubation mit dem in Tris-HCl-Puffer gelösten Peroxidase-konjugierte ABC-System (Vectastain® ABC-Kit, Elite PK-6101 RABBIT IgG) wurde über 1 h durchgeführt.
- Für die Visualisierung fand das Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB SUBSTRATE KIT FOR PEROXIDASE, SK-4100; Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) nach Herstellerangaben Verwendung. Die Dauer der Farbreaktion lag bei 6 min.
- Nach Abschluss der Gegenfärbung wurden die Gewebe zweimal für je 2 min in 95 %igem und 100 %igem Ethanol und für je 3 min in Xylol dehydriert.
- Eine dauerhafte Konservierung der Proben gelang durch das Eindecken in dem synthetischen Medium Assistent-Histokitt.

3.6.1.2.2 Auswertung Der erste Schritt der mikroskopischen Auswertung war die Durchsicht der Negativkontrolle. Anschließend wurden bei 400-facher Vergrößerung pro Hund 20 Tubuli seminiferi contorti meanderförmig aufgesucht und evaluiert.

Dabei erfolgte die Feststellung des Entwicklungszustandes eines jeden Tubulus seminiferus contortus. Im weiteren wurden die in einem Tubulus seminiferus contortus vorkommenden Ki-67-positiven Zelltypen identifiziert. Anschließend wurden pro Tubulus seminiferus contortus sowohl die Anzahl immunhistochemisch positiver als auch die Gesamtzahl sicher identifizierbarer Spermatogonien ermittelt. Die Ergebnisdokumentation erfolgte bei 200-facher Vergrößerung.

3.6.1.3 Apoptosemarker Caspase-3 aktiviert

3.6.1.3.1 Immunhistochemische Darstellung Die Detektion apoptotischer Zellen erfolgte mithilfe des monoklonalen „Purified Rabbit Anti- Active Caspase-3 (Clone C92-605)“-Antikörpers der Firma BD Pharmingen in einem Proteingehalt von $1,0 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Die Negativkontrollen wurden mit dem „RABBIT IgG“ (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) in gleicher Konzentration durchgeführt.

Der immunhistochemische Nachweis der Apoptose wurde an Formalin-fixierten Gewebeschnitten durchgeführt. Pro Hund wurden ein bis drei Proben mit dem Primärantikörper

und jeweils eine als Negativkontrolle mit dem Kontrollserum inkubiert.

Der Schnitt eines in 10 %igem Formalin fixierten caninen Lymphknotens, welcher vom Institut für Veterinär-Pathologie, Justus-Liebig-Universität Giessen zur Verfügung gestellt worden war, diente als positives Kontrollgewebe und ermöglichte zudem einen Vergleich mit der apoptotischen Detektionsmethode TUNEL (siehe Kapitel 4.4.1.1).

Grundsätzlich verlief auch diese immunhistochemische Färbung entsprechend des in Kapitel 3.6.1.1.1 für den Androgenrezeptor beschriebenen Protokolls. Nachfolgend sollen daher ausschließlich davon abweichende Punkte aufgeführt werden.

- Die Deparaffinierung erfolgte durch zweimaliges je 5-minütiges Eintauchen der Gewebeschnitte in Xylol und die sich anschließende Rehydrierung fand ihren Abschluss durch Spülen in fließendem Leitungswasser.
- Im Anschluss an das Antigen-Retrieval wurden die Proben ebenfalls unter fließendem Leitungswasser gespült.
- Nach dem Blocken der endogenen Peroxidaseaktivität erfolgten alle weiteren Waschschrte und Verdünnungen mit einem Immuncytochemistry (ICC)-Puffer.
- Die Inkubation mit dem Primärantikörper bzw. dem Kontrollserum erfolgte über 23 h und wurde durch ein kurzes Spülen der Proben mit ICC-Puffer vor dem eigentlichen Waschschrte beendet.
- Die Inkubation des Sekundärantikörpers, welcher nach Herstellerangaben in Blockierungsserum gelöst worden war, dauerte 30 min. Es folgte die Entfernung von ungebundenen Zweitantikörper durch dreimaliges, je 5-minütiges Spülen.
- Anschließend wurden die Schnitte ebenfalls für 30 min mit dem in ICC-Puffer gelösten Peroxidase-konjugierten Avidin-Biotin-Complex (Vectastain® ABC-Kit, Elite PK-6101 RABBIT IgG) inkubiert.
- Die Farbreaktion erfolgte innerhalb von 8 min bei Raumtemperatur nach Zugabe des Chromogens 3,3'-Diaminobenzidin (DAB SUBSTRATE KIT FOR PEROXIDASE, SK-4100; Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA).

- Im Anschluss an die Gegenfärbung wurden die Gewebe je zweimal für 5 min in einer aufsteigenden Alkoholreihe aus 70, 95 und 100 %igem Ethanol und schließlich in Xylol dehydriert.
- Mittels des synthetischen Eindeckmediums Assistent-Histokitt gelang die dauerhafte Fixierung der Proben.

3.6.1.3.2 Auswertung Im Anschluß an die Sichtung der Negativkontrollen erfolgte die mikroskopische Auswertung der immunhistochemischen Färbung. Bei 400-facher Vergrößerung wurden insgesamt 36 Gesichtsfelder pro Hund (1 bis 2 Schnittpräparationen) in meanderförmiger Abfolge aufgesucht. Da neben spezifischen auch offensichtlich unspezifische Farbniederschläge beobachtet werden konnten, wurden ausschließlich eindeutig immunhistochemisch positiv gefärbte Zellen erfasst. Eine Unterscheidung hinsichtlich des Zelltyps unterblieb, sodass die Summe positiver Signale sowohl inter- als auch intratubuläre vegetative und germinative Zellen einschließt.

Die exemplarische Dokumentation positiver immunhistochemischer Signale erfolgte in 100-, 200-, 400- und gegebenenfalls in 1000-facher Vergrößerung.

3.6.2 Doppelfärbung

Eine Besonderheit der immunhistochemischen Untersuchung stellt die Doppelfärbung dar. Diese bedarf eines besonderen methodischen Vorgehens und ermöglicht die gleichzeitige Visualisierung zweier unterschiedlicher Antigene an einer Schnittpräparation.

3.6.2.1 Androgenrezeptor / Vimentin

Die Doppelfärbung im Rahmen dieser Untersuchung diente der gleichzeitigen Darstellung von Androgenrezeptor- sowie Vimentin-Antigenen.

Die Detektion des Androgenrezeptors erfolgte prinzipiell wie in Kapitel 3.6.1.1.1 beschrieben. Jedoch wurden sowohl der polyklonalen Kaninchen-Antikörpers „AR (N-20): sc-816“ (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) als auch das „Rabbit IgG“-Kontrollserum (Vector Laboratories) in einer Konzentration von $2,0 \times 10^{-4}$ µg/µl angewendet.

Das Vimentin-Epitop wurde mittels „Monoclonal Mouse Anti-Vimentin, Clone V9“-Primärantikörper (DakoCytomation Denmark A/S, Denmark) nachgewiesen. Die Anwendungskonzentration von $2,3 \times 10^{-4} \mu\text{g}/\mu\text{l}$ entsprach der als Negativkontrolle verwendeten „Mouse IgG₁ Ab-1 (Clone NCG01)“-Isotypenkontrolle (DIANOVA GmbH, Hamburg). Alkalische Phosphatase-konjugierte Sekundärantikörper detektierten die Antigen-Antikörper-Komplexe im Rahmen einer indirekten Methode. Die Visualisierung erfolgte unter Verwendung der Chromogene 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP) und Nitroblau-Tetrazoliumsalz (NBT), welche gemäß MCGADEY (1970) miteinander zu den sich niederschlagenden blauen Verbindungen 5,5'-Bromo-4,4'-chloro-indigo und Di-Formazan reagieren.

Im Hinblick auf die Fragestellung wurden lediglich Bouin-fixierte Schnittpräparationen der Tiere aus den Versuchsgruppen „Gonazon®“ DG A, „Profact®“ und „juvenil“ einer Doppelfärbung unterzogen. Die Negativkontrollen erfolgten beispielhaft an je einem randomisiert ermittelten Hund pro Gruppe.

Die Entparaffinierung und Rehydrierung, das Antigen-Retrieval sowie das Blocken endogener Peroxidasen der Gewebepreparationen erfolgte wie in Kapitel 3.6.1.1.1 beschrieben. Anschließend wurden die Schnitte in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 35 min mit Blockierungspuffer inkubiert. Dieser bestand aus einem 1,43 %igen BSA-1xPBS-Puffer mit 0,03 % Triton X-100, welchem sowohl anteilig 10 % eines Pferdeserums als auch ein Ziegenserum (Vectastain® ABC-Kit, Elite PK-6101 RABBIT IgG) nach Herstellerangaben zugefügt worden waren. Die sich anschließende Inkubation der Erst-Antikörper bzw. Kontrollseren verlief in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurden die Gewebe für 60 min mit dem in Tris-HCl-Puffer verdünnten Vimentin-Antikörper (DakoCytomation) bzw. verdünnter Maus-IgG-Isotypenkontrolle überschichtet und in einer feuchten Kammer bei 37 °C im Wärmeschrank aufbewahrt. Der zweite Schritt bestand in der Inkubation der Proben mit dem ebenfalls in Tris-HCl-Puffer gelösten Androgenrezeptor-Antikörper bzw. Kaninchen-IgG-Kontrollserum, welche in einer feuchten Kammer bei 4 °C über 20 h durchgeführt wurde. Nach einer erneuten dreimaligen Spülung in Tris-HCl-Puffer für je 5 min erfolgte die gleichzeitige Behandlung mit beiden Zweit-Antikörpern.

Es wurden der Alkalische-Phosphatase-gekoppelte Pferd Anti-Maus IgG-Antikörper AP-2000 (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) im Verhältnis 1:1000 sowie ein Horseradish Peroxidase (HRP)-konjugierter Ziegen-anti-Kaninchen-Antikörper (Vectastain® ABC-Kit, Elite PK-6101 RABBIT IgG) entsprechend den Herstellerangaben in Blockierungspuffer verdünnt und die Gewebeproben damit in einer feuchten Kammer für 50 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der dreimaligen je 5-minütigen Spülung in Tris-HCl-Puffer erfolgte in einer feuchten Kammer die Sichtbarmachung des Vimentins mittels der in Genius III-Puffer gelösten Chromogene BCIP und NBT. Nach 30 min bei RT beendete das 5-minütige Wässern der Proben in Aqua bidest schließlich die Farbreaktion.

Die die zweite Farbreaktion vermittelnde Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex sowie die Färbung mit dem Chromogen AEC, die Gegenfärbung und die Konservierung der Gewebeproben verliefen entsprechend Kapitel 3.6.1.1.1.

3.6.2.1.1 Auswertung Nach Prüfung der Negativkontrollen erfolgte eine eingehende mikroskopische Begutachtung der Doppelfärbungen bei unterschiedlicher Vergrößerung (100-, 200-, 400- und 1000-fach). Diese bot zum einen eine gute Möglichkeit, sich in die Differenzierung von Spermatogonie und Sertolizelle einzufinden, zum anderen diente sie dem Nachweis immunhistochemisch AR-positiver Spermatogonien.

3.7 TUNEL

Die TdT-mediated dUTP-Biotin Nick End Labeling (TUNEL)-Methode zum Nachweis apoptotischer Zellen wurde erstmals von GAVRIELI et al. (1992) beschrieben. Zugrunde liegend ist das im Rahmen der Apoptose vermehrte Vorkommen fragmentierter zellulärer ein- und doppelsträngiger Desoxyribonukleinsäuren (DNA). Diese exponieren an ihren freien Bruchenden 3'-Hydroxylgruppen, welche unter Katalyse des Enzyms Terminale Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) eine Bindung mit dem Marker-konjugierten Nukleotid 2'-Deoxyuridine, 5'-Triphosphate (dUTP) eingehen.

3.7.1 ApopTag® Peroxidase Kit

Während GAVRIELI et al. (1992) Biotin-gekoppelte dUTPs verwendeten, findet bei dem in dieser Arbeit eingesetzten ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit das pflanzliche Steroid Digoxigenin als Marker Anwendung. Nach Bindung eines das Enzym Peroxidase tragenden Anti-Digoxigenin-Antikörpers erfolgt schließlich die Visualisierung des Nick End Labeling (NEL) durch Zugabe und enzymatische Umsetzung des chromogenen Substrates DAB.

Die Darstellung apoptotischer Zellen mittels ApopTag® Peroxidase Kit erfolgte anhand eines der Positivkontrolle dienenden, in 10 %igem Formalin fixierten caninen Lymphknotens. Dieser war durch das Institut für Veterinär-Pathologie der JLU Giessen zur Verfügung gestellt worden.

Die Versuchsdurchführung erfolgte grundlegend nach den für paraffiniertes Gewebe angegebenen Herstellerangaben des ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit. Das experimentelle Vorgehen inklusive vorgenommener Adaptationen ergab sich wie nachfolgend beschrieben.

Zunächst erfolgte die Deparaffinierung der Schnittpräparationen in einem zweimaligen je 5-minütigen Xylolbad. Anschließend wurden die Schnitte zweimal für 5 min in absolutem Alkohol, danach je einmal für 3 min in 95 %igem und 70 %igem Alkohol und letztlich für 5 min in 1xPBS-Puffer rehydriert. Zur Freilegung der genomischen DNA wurde ein jeder der circa 1 cm² großen Gewebeschnitte für 15 min bei Raumtemperatur mit circa 12 µl Proteinase K-Lösung überschichtet. Ein zweimaliges Spülen für je 2 min in autoklaviertem DEPC-Wasser beendete die proteolytische Reaktion. Das 5-minütige Blockieren der endogenen Peroxidase erfolgte durch großzügiges Bedecken der Gewebeschnitte mit jeweils circa 100 µl einer 3,0 %igen, durch 1xPBS-Puffer verdünnten 30 %igen H₂O₂-Lösung. Nach zweimaligem 5-minütigem Spülen in 1xPBS-Puffer wurden die Proben zur Reduzierung einer möglichen Hintergrundfärbung für 30 min mit je 15 µl Equilibrierungspuffer behandelt. Im direkten Anschluß erfolgte das Nick End Labeling, die eigentliche Detektion

der DNA-Strangbrüche. Hierzu wurde ein Gewebeschnitt mit circa 11 µl einer sowohl die Digoxigenin-konjugierten Nukleotide als auch das Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT)-Enzym enthaltenden „Working Strength TdT-Enzyme“-Lösung (siehe Tabelle 3.8) überschichtet und bei 37 °C in einer feuchten Kammer über 1 h inkubiert. Entsprechend erfolgte die Inkubation der Negativkontrolle mit circa 11 µl einer aus 70 µl Reaktionspuffer und 30 µl Equilibrierungspuffer bestehenden Lösung.

Tabelle 3.8: Zusammensetzung der „Working Strength TdT-Enzyme“-Lösung

Komponente (Konzentration)	Volumen (µl)/Ansatz
Reaction Buffer	77,00
TdT-Enzyme	10,00
DEPC-Wasser autoklaviert	23,00
Working Strength TdT-Enzyme-Lösung	110,00

Danach wurden die Proben für 10 min bei Raumtemperatur in einer nach Herstellerangaben hergestellten „Working Strength Stop/Wash Buffer“-Lösung gespült.

Nachdem die Gewebeschnitte dreimal für je 1 min in 1x PBS-Puffer gespült worden waren, wurden sie bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer für 30 min mit je circa 13 µl Anti-Digoxigenin Konjugat inkubiert. Durch viermaliges je 2-minütiges Spülen der Schnitte in 1x PBS-Puffer wurde das überschüssige Konjugat entfernt. Die sich anschließende farbliche Visualisierung der DNA-Strangbrüche erfolgte in einer feuchten Kammer im Rahmen einer 6-minütigen Inkubation mit je circa 15 µl des nach Herstellerangaben hergestellten „Working Strength Peroxidase Substrate“.

Die Farbumsetzung wurde durch eine dreimalige je 1-minütige sowie eine 5-minütige Spülung der Proben in Aqua bidest beendet. Es folgte die Gegenfärbung der Proben in einer wässrigen Hämatoxylin-Lösung (1:1) unter optischer Kontrolle. Das Entfernen der Färbelösung erfolgte durch je zehnmaliges Tauchen der Proben in zwei Aqua bidest-Bäder sowie einem 30 s andauernden Bad in Aqua bidest. Entsprechend wurden die Proben in 100 %igen 1-Butanol-Bädern dehydriert und anschließend dreimal über je 2 min in Xylol

gespült. Mithilfe des wasserfreien Eindeckmediums Assistent Histokitt gelang die dauerhafte Konservierung der Gewebeproben.

Die Lagerung der Präparate erfolgte in Präparatekästen bei einer Temperatur von 4 °C.

3.7.1.1 Auswertung

Die Sichtung und Dokumentation des Versuchsergebnisses erfolgte mithilfe des Durchlichtmikroskop Leitz DMRM sowie der daran angeschlossenen Digitalkamera Leica DC300 in einer 100-fachen Vergrößerung.

Im Anschluss an die Durchsicht der Negativkontrolle erfolgte anhand des gewählten Kontrollpräparates eine hinsichtlich Signalverteilung und -intensität subjektiv vergleichende Beurteilung der beiden unterschiedlichen apoptotischen Nachweismethoden.

3.8 Molekularbiologische Untersuchungen

3.8.1 Reverse Transkriptase - Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Bei der Reverse Transkriptase - Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR), welche dem Nachweis der Genexpression auf Stufe der Transkription dient, handelt es sich um ein kombiniertes molekularbiologisches Verfahren. Während in einem ersten Schritt die exprimierte RNA mittels reverser Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben wird, erfolgt in einem weiteren Schritt die enzymatische Amplifikation spezifischer cDNA-Sequenzen im Rahmen der Polymerase-Kettenreaktion.

Die Lagerung sämtlicher im Rahmen der RT-PCR benötigten Komponenten sowie alle durchgeführten Arbeitsschritte erfolgten unter ständiger Kühlung auf Eis.

3.8.1.1 DNase-Behandlung

Die der RT-PCR vorausgehende DNase-Behandlung der gewonnenen RNA-Präparationen (vgl. Kapitel 3.3.2.2.2) diente der Vermeidung falsch positiver PCR-Resultate aufgrund

möglicher Kontaminationen mit genomischer DNA und deren Amplifikaten.

Die Herstellung eines für die DNase-Behandlung benötigten Ansatzes erfolgte in einem 0,5 ml-Reaktionsgefäß gemäß der in Tabelle 3.9 beschriebenen Angaben.

Tabelle 3.9: Zusammensetzung des DNase-Mixes (Einfachansatz)

Komponente (Konzentration)	Volumen (µl)/Ansatz
DNase I Inkubationspuffer (10 x)	2,00
DNase I, RNase frei (10 U/µl)	1,00
RNase-Inhibitor (40 U/µl)	0,25
DNase-Mix (Einfachansatz)	3,25

Anschließend wurde der Ansatz mit 6,65 µl der entsprechenden RNA-Lösung (0,2 µg/µl), im Falle der Negativkontrolle mit DEPC-Wasser, auf ein Endvolumen von 9,90 µl gebracht und kurz durchmischt. Es schloss sich die eigentliche DNase-Behandlung in einem Biometra® T1 Thermocycler 48 nach dem in Tabelle 3.10 beschriebenen Protokoll an.

Tabelle 3.10: Temperaturprotokoll zur DNase-Behandlung

t (min)	T (°C)	Funktion
10	37,0	Zerstörung der genomischen DNA
5	75,0	Inaktivierung der DNase
forever	4,0	Zwischenlagerung (kurzfristig)

Aufgrund der geringen Stabilität der RNA erfolgte die Durchführung der reversen Transkription im direkten Anschluss an die DNase-Behandlung.

3.8.1.2 Reverse Transkription

In der reversen Transkription erfolgt bei Vorliegen von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP) die Umschreibung von RNA in cDNA mithilfe von enzymatisch aktiven, RNA-

abhängigen DNA-Polymerasen, den sogenannten Reversen Transkriptasen (RT).

Das Ausgangsmaterial für die cDNA-Synthese stellte die DNase-behandelte RNA dar. Die Durchführung der reversen Transkription erfolgte in Anlehnung an das vom Hersteller des verwendeten GeneAmp® Gold RNA PCR Core Kit empfohlene Protokoll. Als Startprimer dienten unspezifisch bindende Primer (Random Hexamers). Der Einfachansatz des RT-Mastermixes setzte sich wie in Tabelle 3.11 beschrieben zusammen.

Tabelle 3.11: Zusammensetzung des RT-Mastermixes (Einfachansatz)

Komponente (Konzentration)	Volumen (µl)/Ansatz
MgCl ₂ (25 mM)	2,00
PCR-Puffer ohne MgCl ₂ (10 x)	1,00
dNTP (10 mM)	4,00
Random Hexamers (50 µM)	0,50
RNase-Inhibitor (20 U/µl)	0,50
Reverse Transkriptase (50 U/µl)	0,50
RT-Mastermix (Einfachansatz)	8,50

Dem in einem 0,5 ml-Reaktionsgefäß befindlichen 8,50 µl RT-Mastermix wurden 1,5 µl der entsprechenden DNase-behandelten RNA zugegeben, sodass die der reversen Transkription zugeführte Reaktionslösung circa 20 ng RNA pro µl enthielt. Für die Negativkontrolle wurde der RT-Mastermix unter Beibehaltung der Volumina mit DNase-behandeltem DEPC-Wasser versetzt. Nach kurzem Mischen und Überführen der Proben in den Biometra® T1 Thermocycler 48 erfolgte die reverse Transkription entsprechend dem in Tabelle 3.12 beschriebenen Protokoll.

Tabelle 3.12: Temperaturprotokoll zur reversen Transkription

t (min.)	T (°C)	Funktion
8	21,0	Optimierung der Primer-RNA-Hybridisierung
15	42,0	Reverse Transkription
5	99,0	Inaktivierung der Reversen Transkriptase (RT)
5	5,0	
forever	4,0	

Da die während der reversen Transkription synthetisierte cDNA eine gute Stabilität aufweist, war auch eine spätere Weiterverarbeitung nach Lagerung bei -20 °C möglich.

3.8.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) handelt es sich um ein Verfahren, welches die enzymatische Amplifikation spezifischer Desoxyribonukleotidsequenzen in vitro ermöglicht (MULLIS und FALOONA, 1987).

Grundlegende Komponenten der PCR sind die als Template dienende cDNA, das genspezifische Primerpaar sowie die DNA-abhängige DNA-Polymerase:

- Template:

Als Template diente die während der reversen Transkription gewonnene cDNA.

- Primer:

Die für den caninen Androgen-Rezeptor sowie die canine Caspase-3 genspezifischen Vorwärts (for)- und Rückwärts (rev)-Primer waren unter Zuhilfenahme der Software Oligo Analyzer 1.0.2/Oligo Explorer 1.1.0 ausgewählt und mittels Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) des National Center for Biotechnology Information (NCBI) auf ihre Spezifität überprüft worden. Die Herstellung der Androgenrezeptor-Primer war durch das Unternehmen Eurogentec S.A., Belgien, die des Primerpaares

für Caspase 3 durch die Firma biomers.net GmbH, Deutschland erfolgt.

Die gleichzeitige Erfassung der Expression des Housekeeping Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) diente als Standard zur Überprüfung einer effizienten cDNA-Synthese und der Integrität der transkribierten cDNA. Die caninen GAPDH-Primer wurden von dem Unternehmen biomers.net GmbH, Deutschland bezogen.

Eine detaillierte Übersicht der für die genspezifische Amplifikation von caninem GAPDH, AR und Caspase-3 angewandten Primersequenzen, inklusive Accession-Nummern (GenBank bzw. NCBI) der zugrunde liegenden Nukleotidsequenz und Länge der Amplifikate (bp), findet sich in Tabelle 3.13.

Tabelle 3.13: Nukleotidsequenzen der in der PCR verwendeten forward (for)/reverse (rev) Primer (Canis lupus familiaris)

Accession-Nr. (GenBank bzw. NCBI)	Primer	5'-Nukleotidsequenz-3'	Amplifikat Basenpaare (bp)
AB038240	GAPDH for	GCC AAG AGG GTC ATC ATC TC	228
	GAPDH rev	GGG GCC GTC CAC GGT CTT CT	
NM_001003053	AR for	CTT CCT GGC ACA CTC TCT TC	233
	AR rev	CAT CTC GCT TTT GAC ACA AC	
NM_001003042	Casp3 for	CAA TGG ACT CGG GAA TGT C	593
	Casp3 rev	CAG CAT CGC ACA AAG TGA C	

- DNA-abhängige DNA-Polymerase:

Zur Steigerung der Reaktionsspezifität erfolgte die Anwendung einer chemisch modifizierten DNA-abhängigen *Thermus aquaticus* (Taq)-DNA-Polymerase (AmpliTaQ Gold® DNA Polymerase). Diese bedurfte einer als Hot-Start beschriebenen thermischen Aktivierung, sodass eine unspezifische Bindung und Elongation der Primer bei niedrigeren Temperaturen vermieden wurde.

In einem ersten Schritt wurden die Puffersubstanzen wie in Tabelle 3.14 angegeben zu einem Prä-Mix gemischt und anschließend in diesen die entsprechende Primerpaar-Vor-

verdünnung hinzu pipettiert. Diese bestand aus je einem Anteil Vorwärts- und Rückwärts-Primer (20 pmol/ μ l), sodass in der Vorverdünnung jeder Primer in einer Konzentration von 10 pmol/ μ l vorlag. Die Zugabe der DNA-abhängigen DNA-Polymerase vervollständigte den PCR-Primer-Mix (Tabelle 3.15). Schließlich wurde die Lösung gründlich durchmischt.

Tabelle 3.14: Zusammensetzung des PCR-Prä-Mix (Einfachansatz)

Komponente (Konzentration)	Volumen (μ l)/Ansatz
MgCl ₂ (25 mM)	2,00
PCR-Puffer ohne MgCl ₂ (10 x)	4,00
DEPC-Wasser	32,75
PCR-Prä-Mix (Einfachansatz)	38,75

Tabelle 3.15: Zusammensetzung des PCR-Primer-Mix (Einfachansatz)

Komponente (Konzentration)	Volumen (μ l)/Ansatz
PCR-Prä-Mix	38,75
Primerpaar-Vorverdünnung (10 pmol/ μ l je Primer)	1,00
AmpliTaQ Gold [®] (5 U/ μ l)	0,25
PCR-Primer-Mix (Einfachansatz)	40,00

Anschließend wurden 40 μ l PCR-Primer-Mix sowie die 10 μ l der in der reversen Transkription gewonnenen cDNA in ein 0,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und gründlich durchmischt. Als Negativkontrolle diente die Probe, welche bereits in der DNase-Behandlung DEPC-Wasser anstatt RNA enthalten hatte und anschließend auch der reversen Transkription unterzogen worden war. Sinn dieser Negativkontrolle war es, mögliche Kontaminationen des Substrates und der Lösungen mit RNA oder DNA nachweisen bzw. ausschließen zu können. Schließlich erfolgte in einem Biometra[®] T1 Thermocycler 48 die Durchführung einer Hot-Start-PCR entsprechend der nachstehenden Tabelle 3.16. Die Primer-DNA-Hybridisierung (Annealing) erfolgte für die Zielgene AR, Caspase-3 und GAPDH bei einer Annealing-Temperatur (T_A) von 60 °C.

Tabelle 3.16: Temperaturprotokoll der PCR (Annealing-Temperatur (T_A) AR, Caspase-3 und GAPDH: 60 °C)

t (min)	T (°C)	Funktion
10,0	95,0	Aktivierung der AmpliTaq Gold® & Initiale Denaturierung
Elongationszyklus (35 Wiederholungen):		
1,0	94,0	Denaturierung
2,0	T_A	Primer-DNA-Hybridisierung (Annealing)
1,5	72,0	Elongation
10,0	72,0	finale Elongation
forever	4,0	

Nach Beendigung der PCR wurden die Proben entweder direkt oder nach Zwischenlagerung bei -20 °C einer Analyse mittels Agarose-Gelelektrophorese zugeführt.

3.8.2 Isolierung der PCR-Produkte

Die Isolierung der in der PCR gewonnenen Amplifikate erfolgte mittels Extraktion nach gelelektrophoretischer Auftrennung und ermöglichte die Sequenzierung der cDNA zur Überprüfung der Primer-Spezifität.

3.8.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese erfolgte für jedes Primer-spezifische Amplikon exemplarisch an je einem Tier pro Versuchsgruppe „Gonazon®“ DG A bis DG D, „Kontrolle adult“, „Profact®“ und „juvenil“.

Für die Herstellung eines 2%igen Agarose-Gels wurden in einem Mikrowellengerät 1,82 g Agarose in 91 ml eines 1x TBE-Puffers aufgekocht. Nachdem das flüssige Agarose-Gel auf eine Temperatur von circa 60-80 °C abgekühlt war, erfolgte die Zugabe von 1,9 µl einer 1%igen Ethidiumbromidlösung. Die Lösung wurde gründlich durchmischt und ohne Ein-

schluss von Luftblasen in die Gießvorrichtung der horizontalen Elektrophoresekammer EasyPhor Medi gegossen. Unmittelbar danach wurde ein 20-zähniger Kamm eingefügt, welcher als Platzhalter für die späteren Geltaschen diente. Das Gel polymerisierte bei Raumtemperatur. Anschließend wurde es in die mit 1x TBE-Puffer befüllte Elektrophoresekammer überführt und diese gegebenenfalls mit der gleichen Pufferlösung so aufgefüllt, dass der Flüssigkeitsspiegel circa 0,5 cm oberhalb des Agarose-Gels lag.

Entsprechend der in Tabelle 3.17 gezeigten Übersicht wurden die Geltaschen mit einem als „Probe“ bezeichneten Gemisch aus 15 µl des zu analysierenden PCR-Produktes und 1,5 µl Ladepuffer (6x Loading Dye Solution) bzw. mit der DNA-Molekulargewichtsmarkerlösung befüllt. Letztere setzte sich aus 1,5 µl 6x Loading Dye Solution, 1,0 µl des Massestandards GeneRulerTM 100 bp PLUS DNA Ladder und 7,0 µl autoklaviertem DEPC-Wasser zusammen.

Die circa 40-minütige elektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte mithilfe des Netzgerätes Power Supply 2301 Macrodrive 1 bei einer Spannung von 125 V und einer maximalen Stromstärke von 300 mA. Die sich anschließende Visualisierung und Dokumentation der aufgetrennten Amplifikate erfolgte unter Verwendung eines UV-Transilluminators mit integrierter Kamera (Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Justus-Liebig-Universität Giessen) bei einer Wellenlänge von 312 nm.

Tabelle 3.17: Belegung der Probetaschen für die Agarose-Gelelektrophorese

Probetasche 1		
Probetasche 2	Ladder	GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder
Probetasche 3	AR/Casp3	Probe „Gonazon®“ DG A (NickW)
Probetasche 4	AR/Casp3	Probe „Gonazon®“ DG B (LeoB)
Probetasche 5	AR/Casp3	Probe „Gonazon®“ DG C (StrolchS)
Probetasche 6	AR/Casp3	Probe „Gonazon®“ DG D (BrunoM)
Probetasche 7	AR/Casp3	Probe „Kontrolle adult“ (Ben)
Probetasche 8	AR/Casp3	Probe „juvenil“ (JackD)
Probetasche 9	AR/Casp3	Probe „Profact®“ (FlohG)
Probetasche 10	AR/Casp3	Probe Negativkontrolle
Probetasche 11	Ladder	GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder
Probetasche 12	GAPDH	Probe „Gonazon®“ DG A (NickW)
Probetasche 13	GAPDH	Probe „Gonazon®“ DG B (LeoB)
Probetasche 14	GAPDH	Probe „Gonazon®“ DG C (StrolchS)
Probetasche 15	GAPDH	Probe „Gonazon®“ DG D (BrunoM)
Probetasche 16	GAPDH	Probe „Kontrolle adult“ (Ben)
Probetasche 17	GAPDH	Probe „juvenil“ (JackD)
Probetasche 18	GAPDH	Probe „Profact®“ (FlohG)
Probetasche 19	GAPDH	Probe Negativkontrolle
Probetasche 20		

3.8.2.2 Gel-Extraktion

Die Gel-Extraktion beschränkte sich auf die „Kontrolle adult“ und erfolgte gemäß den Herstellerangaben unter Verwendung des QIAEXII Gel Extraction Kits. Dabei wurde wie folgt vorgegangen: Die mithilfe der Mineralight® Lamp im UV-Licht (312 nm) detektierten cDNA-Banden wurden mit einer sterilen Skalpellklinge aus dem Gel ausgeschnitten und einzeln in bereits abgewogenen DNase-freie 2,0 ml-Reaktionsgefäße überführt. Nach erneutem Wiegen erfolgte die Ermittlung des Taragewichts der Gelstücke.

Entsprechend ihres Gewichtes wurde nun jede Gelprobe mit dem dreifachen Volumen an QX 1-Puffer sowie 30 µl der resuspendierten QIAEX II-Lösung überschichtet und ausgiebig gemischt. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße für 10 min in ein 50 °C temperiertes Schüttelwasserbad überführt, welchem sie alle 2 min kurz zum Durchmischen entnommen wurden. Es folgte eine 30 s andauernde Zentrifugation der Reaktionsgefäße bei 20159,8 *g* (14000 U/min). Nachdem die Überstände in den einzelnen Reaktionsgefäßen mittels Pipette entfernt worden waren, wurden die zurückgebliebenen Pellets in je 500 µl QX 1-Puffer durch Mischen gelöst und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Im Anschluss an das erneute Verwerfen der Überstände wurde ein jeder Niederschlag in 500 µl PE-Puffer resuspendiert und erneut abzentrifugiert (siehe oben). Nach vollständiger Wiederholung des letztbeschriebenen Aufreinigungsprozesses mit PE-Puffer erfuhren die Pellets eine circa 30-minütige Lufttrocknung bei Raumtemperatur. Danach wurden die Niederschläge in je 20 µl TE-Puffer aufgelöst, die Proben intensiv gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss an eine 30 s andauernde Zentrifugation der Proben bei 20159,8 *g* (14000 U/min) erfolgte die Überführung der DNA-haltigen Überstände in neue, DNase-freie 0,5 ml-Reaktionsgefäße.

Die sich anschließende Sequenzierung erfolgte durch die Firma SRD Scientific Research and Development, Bad Homburg.

3.8.3 Reverse Transkriptase - quantitative real-time

Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)

Bei der Reverse Transkriptase - quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) handelt es sich um ein auf dem Prinzip der konventionellen PCR beruhenden Verfahren, welches den zusätzlichen Nutzen einer Quantifizierung der Reaktionsprodukte bietet.

Die Aufbereitung der RNA (DNase-Behandlung, reverse Transkription) war bereits im Rahmen der RT-PCR durchgeführt worden (siehe Kapitel 3.8.1.1 und 3.8.1.2). Die resultierende cDNA fand in der Bestimmung der Expression von AR und Caspase-3 mittels

quantitativer real-time PCR (qPCR) Anwendung.

3.8.3.1 Quantitative real-time PCR (qPCR) mit TaqMan[®]-Hydrolyse-Sonden

Das Prinzip der TaqMan[®]-qPCR beruht auf dem von HOLLAND et al. (1991) beschriebenen, die 5'3'-Exonukleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase nutzenden 5'-Nuclease PCR Assay und ermöglicht, bei zeitgleichem Vorhandensein der für die Amplifikation benötigten spezifischen Primer sowie einer fluoreszenzmarkierten, sequenzspezifischen Gensonde, die direkte Quantifizierung der Amplifikate (SCHILD, n. d.).

SCHILD (n. d.) erläutert die Methodik der quantitativen real-time qPCR mit TaqMan[®]-Hydrolyse-Sonden unter Verwendung der die 5'3'-Exonukelaseaktivität aufweisenden AmpliTaq DNA Polymerase wie folgt:

Die circa 20 bis 30 Nukleotide umfassende Gensonde besitzt in der Regel an ihrem 5'-Ende den als Reporter fungierenden, kovalent gebundenen Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxy-Fluorescein (6-FAM) sowie am 3'-Ende den über ein Linker-Arm-modifiziertes-Nukleotid (LAN) gekoppelten Quencher-Farbstoff 6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin (TAMRA). Aufgrund der räumlichen Nähe von Reporter- und Quencherfarbstoff, verhindert der Fluoreszenz-Energietransfer (FET) bei intakter Sonde die unter Anregung auftretende Fluoreszenz. Die Gensonde hybridisiert ebenso wie die Primer sequenzspezifisch an die DNA-Template. Im Rahmen der von den Primern ausgehenden Elongation einer komplementären Sequenz erfährt die Sonde durch die 5'-Exonukleaseaktivität der fortschreitenden Taq-DNA-Polymerase eine Hydrolyse. Die damit verbundene räumliche Trennung von Quencher und Reporter führt schließlich bei Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes zur Emission eines Lichtsignals.

PFAFFL (2006) beschreibt, dass sich die Fluoreszenzzunahme über ein großes Intervall an Zyklen hinweg direkt proportional zur Anzahl der neusynthetisierten PCR-Produkte verhält und somit die Startmenge an cDNA ermittelt werden kann.

Entsprechend der konventionellen PCR bedarf die qPCR folgender Grundbausteine:

- Template:

Als Template diene die aus der Gesamt-RNA durch reverse Transkription gewonnene cDNA (siehe Kapitel 3.8.1.1 und 3.8.1.2).

- Primer und Sonde:

Sowohl die für den caninen AR als auch die für die canine Caspase-3 spezifischen Primerpaare und Sonden waren mithilfe der Primer Express Software (Version 2.0, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ausgewählt und von der Firma Eurogentec S.A. (Seraing, Belgien) hergestellt worden.

Die Herstellung des für das canine Referenzgen GAPDH genspezifischen Primer (for/rev)-Sonden-Systems erfolgte durch das Unternehmen biomers.net GmbH, Ulm.

Eine Übersicht der in der qPCR angewandten Primerpaare und Sonden, inklusive Accession-Nummer (GenBank bzw. NCBI) der zugrunde liegenden Nukleotidsequenz, sowie die Größe der Amplifikate in Basenpaaren (bp) findet sich in Tabelle 3.18.

- DNA-abhängige DNA-Polymerase:

Neben der für die TaqMan[®]-qPCR grundlegenden 5'3'-Exonuklease-Aktivität besitzt die DNA-abhängige *Thermus aquaticus* (Taq)-DNA-Polymerase eine extrem hohe Hitzebeständigkeit. Dies ermöglichte die Durchführung einer Hot-Start-qPCR, sodass die Bildung unspezifischer Produkte verhindert werden konnte.

Bei der nachfolgend beschriebenen qPCR fand die iTaq DNA Polymerase, welche Bestandteil des iQTMSupermixes ist, Anwendung.

Alle Arbeitsschritte sowie die zwischenzeitliche Lagerung sämtlicher Komponenten der qPCR erfolgten unter Kühlung auf Eis.

In einem ersten Schritt wurde pro Zielgen ein Gesamtansatz des Mastermixes erstellt, dessen Volumen sich aus der zu bestimmenden Probenanzahl ergab. Nach dem gründlichen Durchmischen erfolgte eine der Anzahl der Proben entsprechende Aliquotierung der Lösung. Dabei ergab sich pro Probe der in Tabelle 3.19 beschriebene Reaktionsansatz.

Tabelle 3.18: Nukleotidsequenzen der in der qPCR verwendeten forward (for)/reverse (rev) Primer (Canis lupus familiaris) und TaqMan®-Hydrolyse-Sonden (S)

Accession-Nr. (GenBank bzw. NCBI)	Primer bzw. Sonde	5´-Nukleotidsequenz-3´	Amplifikat Basenpaare (bp)
AB038240	GAPDH for	GCT GCC AAA TAT GAC GAC ATC A	75
	GAPDH rev	GTA GCC CAG GAT GCC TTT GAG	
	GAPDH S	6-FAM -TCC CTC CGA TGC CTG CTT CAC TAC TAC CTT- TAMRA	
NM_001003053	AR for	GAG CCA GGC GTG GTG TGT	69
	AR rev	GCT AGA GAG CAA GGC TGC AAA	
	AR S	6-FAM -CTG GAC ATG ACA ACA ACC AGC CCG A- TAMRA	
NM_001003042	Casp3 for	ACT TTG TGC GAT GCT GAA ACT A	81
	Casp3 rev	GTT GCG ACC TTT CGG TTA A	
	Casp3 S	6-FAM -AAG CTT GAG TTT ATG CAC ATT CTT ACT- TAMRA	

Tabelle 3.19: Zusammensetzung des qPCR-Mastermixes

Komponente (Konzentration)	Volumen (µl)/Ansatz
iQ TM Supermix (2x)	25,00
Primer forward (20 µM)	0,75
Primer reverse (20 µM)	0,75
TaqMan [®] -Sonde (20 µM)	0,50
DEPC-Wasser	13,00
Mastermix (Probenansatz)	40,00

Zu den jeweils aus 40 µl Mastermix bestehenden Ansätzen wurden 10 µl der entsprechenden cDNA-Probe bzw. das als Negativkontrolle dienende umgeschriebene DEPC-Wasser hinzugegeben. Die nun in dem endgültigen Ansatz einer Probe vorliegende Konzentration der Primer betrug jeweils 300 nM, die der Sonde 200 nM. Im Anschluß an eine gründliche Durchmischung wurden pro Probenansatz zwei Vertiefungen der Thermo-Fast 96 Skirted PCR Plate mit je 23 µl Reaktionslösung befüllt und die Reaktionsplatte schließlich mithilfe einer selbstklebenden optischen Folie verschlossen. Die Durchführung der Hot-Start-qPCR sowie die zyklische Detektion der Fluoreszenz erfolgten in einem CFX96TM Real-Time PCR Detection System wie in Tabelle 3.20 beschrieben.

Tabelle 3.20: Temperaturprotokoll der qPCR

t (min)	T (°C)	Funktion
3,00	95,0	Aktivierung der iTaq DNA Polymerase & Initiale Denaturierung
Elongationszyklus (40 Wiederholungen):		
0,25	95,0	Denaturierung
1,0	60,0	Annealing & Elongation ⇒ Detektion der Fluoreszenz

3.8.3.1.1 Auswertung Die Quantifizierung der qPCR-Produkte basiert auf dem jeweiligen im CFX96TM Real-Time PCR Detection System detektierten Fluoreszenzschwellen-

wert, welcher aus dem Abbau der TaqMan[®]-Sonde resultiert. Der Fluoreszenzschwellenwert beschreibt den Elongationszyklus, in welchem das Fluoreszenzsignal die zu Reaktionsbeginn vorhandene Basis- oder Hintergrundfluoreszenz signifikant überschreitet; er wird als Threshold Cycle (C_T) oder Crossing Point (CP) bezeichnet. Der CP definiert somit den Zeitpunkt im mittleren Drittel der exponentiellen Amplifikationsphase, welcher weder einer negativen Beeinflussung durch die anfängliche Hintergrundfluoreszenz noch einer beginnenden Plateauphase unterliegt. Mathematisch betrachtet verhält sich der CP umgekehrt proportional zum Logarithmus der ursprünglichen Konzentration an cDNA. Dies bedeutet, dass die bis zum Erreichen des Fluoreszenzschwellenwertes benötigte Anzahl an Elongationszyklen und damit der CP umso höher ist, je niedriger die initiale Konzentration der Template ist.

Die Quantifizierung selbst kann sowohl absolut als auch relativ erfolgen. Während eine absolute Quantifizierung der Feststellung einer tatsächlich vorhandenen Anzahl amplifizierter PCR-Produkte anhand eines definierten cDNA-Standards dient, wird im Rahmen einer relativen Quantifizierung die Zunahme eines Zielgens bezogen auf ein Referenzgen ermittelt. Diese semiquantitative Erfassung der PCR-Produkte kann mit und ohne vorhergehende Effizienzkorrektur erfolgen.

Während die nicht Effizienz-korrigierte $\Delta\Delta C_T$ -Methode bei der Amplifikation des Zielgens und des konstitutiv exprimierten Referenzgens eine optimale wie auch vergleichbare Effizienz voraussetzt (PFAFFL, 2006), erlauben Effizienz-korrigierte Methoden eine verlässlichere Quantifizierung bei geringgradig abweichenden Effizienzen (PFAFFL et al., 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit kam eine relative Quantifizierung der Zielgen-Expression bezogen auf die des Referenzgens GAPDH zur Anwendung. Die Ermittlung der Reaktionseffizienzen erfolgte mithilfe einer exponentiellen Verdünnungsreihe (100 %, 10 %, 1 % und 0,1 %). Das Ausgangsmaterial der in Dreifachbestimmung verwendeten Verdünnungen setzte sich aus aliquoten Teilen aller zu untersuchenden cDNA-Proben zusammen (PFAFFL et al., 2002). Die resultierenden CP -Werte zeichneten eine lineare Regressionsgerade, deren Steigung m die Berechnung der Reaktionseffizienz E nach der bei PFAFFL (2001) beschriebenen Gleichung (3.1) ermöglicht:

$$E = 10^{(-1/m)}. \quad (3.1)$$

Um vorhandene Unterschiede in der Effizienz des Ziel- und des Referenzgens zu berücksichtigen, erfolgte die von PFAFFL (2001) beschriebene Effizienzkorrektur der quantitativen Qualifizierung [siehe Gleichung (3.6)].

Dazu mußte in einem ersten Schritt sowohl für das Ziel- als auch das Referenzgen der mittlere CP -Wert einer jeden Probe P in Bezug auf einen Kalibrator K ermittelt werden. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde der Mittelwert der in der Versuchsgruppe „Kontrolle adult“ detektierten CP -Werte als Kalibrator herangezogen.

$$CP_{\text{Zielgen}}(K) - CP_{\text{Zielgen}}(P) = \Delta CP_{\text{Zielgen}}(K - P) \quad (3.2)$$

$$CP_{\text{Referenzgen}}(K) - CP_{\text{Referenzgen}}(P) = \Delta CP_{\text{Referenzgen}}(K - P) \quad (3.3)$$

Nun erfolgt mithilfe der in Gleichung (3.1) errechneten Effizienzen die Korrektur der ΔCP -Werte.

$$\Delta CP(\text{korrigiert})_{\text{Zielgen}}(K - P) = (E_{\text{Zielgen}})^{\Delta CP_{\text{Zielgen}}(K - P)} \quad (3.4)$$

$$\Delta CP(\text{korrigiert})_{\text{Referenzgen}}(K - P) = (E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta CP_{\text{Referenzgen}}(K - P)} \quad (3.5)$$

Schließlich kann durch Division der Effizienz-korrigierten ΔCP -Werte des Zielgens durch die des Referenzgens die Ratio der Genexpression ermittelt werden. Die Ratio R beschreibt die relative Expressionsänderung des Zielgens in Bezug auf das Referenzgen:

$$R = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta CP_{\text{Zielgen}}(K - P)}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta CP_{\text{Referenzgen}}(K - P)}}. \quad (3.6)$$

3.9 Hormonanalyse

Die im Rahmen dieser Studie durchgeführten hormonanalytischen Untersuchungen erfolgten durch das endokrinologische Labor der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz, JLU Giessen.

3.9.1 Testosteron

Die Erfassung der Testosteronkonzentration erfolgte im kompetitiven Radioimmunassay (RIA) nach den im vorausgehend genannten Labor etablierten „Standard Operation Procedures“. Dabei fand das vom Kaninchen stammende und gegen 4-Androsten-11 α ,17 β -diol-3-on-11-HS-BSA gerichtete Antiserum Gi-Testosteron-I Anwendung. Als Tracer diente ^3H -Testosteron.

Die Kalibrierungskurve umfasste 8 Kurvenpunkte zwischen 0,06 ng/ml und 7,4 ng/ml, die untere Nachweisgrenze lag bei 0,1 ng/ml, der Intra- und Interassayvariationskoeffizient betrug 8,2 % bzw. 7,8 % bis 9,0 % (LUDWIG, 2008). Nach RÖCKEN et al. (1995) zeigten sich Kreuzreaktionen vor allem mit Dihydrotestosteron (47 %), während sie ansonsten bei <1 % lagen (Androstendion, 0,84 %; 17 α -Hydroxyprogesteron, 0,49 %; Estradiol-17 β , Progesteron, Estron, Estriol, Cortisol, Pregnenolon sowie Dehydroepiandrosteron, $\leq 0,04$ %).

3.9.2 LH

Die LH-Konzentration des Blutplasmas wurde wie bei JÄGER (2006) und LUDWIG (2008) beschrieben als „Solid-Phase Assay“ unter Verwendung eines auf dem Prinzip des Sequenztests basierenden heterologen, kompetitiven Enzym-Immuno-Assays (EIA) bestimmt. Als Standard diente canines LH. Biotinyliertes bovines LH fungierte als Tracer. Bei dem verwendeten ersten Antikörper handelte es sich um den monoklonalen 518 B7 Mouse anti bovine LH (Dr. Janet Roser, University of California, Davis, CA), der als Solid-Phase dienende zweite Antikörper war Goat anti Mouse IgG Fc specific (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen). Die Extinktionsmessung erfolgte bei 450 nm.

Die Kalibrierungskurve umfasste einen Konzentrationsbereich von 0,2 ng/ml bis 6,4 ng/ml, die untere Nachweisgrenze des Assays lag bei 0,2 ng/ml und die Interassayvariationskoeffizienten betrugen zwischen 12,7 % und 17,3 % (LUDWIG, 2008). Der Intraassayvariationskoeffizient lag nach JÄGER (2006) bei 9,77 % in hohen und 18,59 % in niedrigen Messbereichen.

3.9.3 FSH

Die Bestimmung der Plasmakonzentration an caninem FSH erfolgte nach Herstellerangaben unter Verwendung eines kommerziellen Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)-Kits (Canine FSH ELISA, EIA4536, DRG International Inc., New Jersey, USA). Das Kit enthielt canines FSH als Standard, mit monoklonalem Maus-anti-Hund FSH-Antikörper beschichtete Mikrotiterplatten sowie einen freien Peroxidase-konjugierten, monoklonalen Maus-anti-Hund FSH-Antikörper. Die photometrische Bestimmung der Extinktion erfolgte bei 450 nm.

Die Standardkurve erstreckte sich von 0 ng/ml bis 50 ng/ml, die untere Nachweisgrenze befand sich im Bereich von 0,1 ng/ml. Laut Herstellerangaben lag die Intra- und Interassayvariation zwischen 3,5 % und 7,8 % bzw. 3,95 % und 10,06 %, Kreuzreaktivität existierte mit caninem FSH (100 %), caninem TSH (8,7 %) und caninem LH (6,2 %).

3.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und Analyse der Versuchsergebnisse erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Giessen unter Verwendung der Programmpakete BMDP/Dynamic, Release 8.1 (BMDP Statistical Software, Inc., Statistical Solutions Ltd., Cork, Ireland) und StatXact, Version 9.0.0 (CYTEL Inc., Cambridge, MA, USA).

Die Datenbeschreibung bediente sich im Fall einer angenäherten Normalverteilung quantitativer Merkmale der Angabe des Stichprobenumfanges, des Minimums (min.), des Maximums (max.) sowie des arithmetischen Mittelwertes (\bar{x}) und der Standardabweichung

(SD). Bei rechtsschiefen Verteilungen positiver quantitativer Merkmale wurde eine logarithmische Transformation (\log_{10}) auf die Daten angewendet und die Ergebnisse als geometrischer Mittelwert ($\bar{x}_{geom.}$) und Streufaktor (SF) in Verbindung mit Minimum (min.) und Maximum (max.) dargestellt.

3.10.1 Hormonanalytische Daten

Eine statistische Bearbeitung erfolgte lediglich für die Versuchsgruppe „Gonazon®“ DG A bis DG D (DG D = 17 Hunde). Es wurden folgende Testverfahren durchgeführt:

- Vergleich der Testosteronkonzentrationen im Plasma zu verschiedenen Zeitpunkten vor Explantation des GnRH-Analogons
 - Einfaktorieller Vergleich der Zeitpunkte: Friedmann-Test
 - Paarvergleich mit dem Ausgangswert bei vergleichsbezogenem Signifikanzniveau: Wilcoxon-Test
- Vergleich der Testosteronkonzentrationen im Plasma nach Explantation des GnRH-Analogons
 - Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Messwiederholung über den Faktor Zeit: Wald-Test (wegen nicht vollständig vorhandener Beobachtungen)
 - Paarvergleich mit Ausgangswerten bei vergleichsbezogenem Signifikanzniveau: paarweiser t-Test.

3.10.2 Sonstige analytische Parameter

Alle weiteren statistischen Auswertungen betrafen zum einen die Versuchsgruppen „Gonazon®“ DG A bis DG D (DG D = 5 Hunde) und „Kontrolle adult“ [Datenanalyse I (DatA I)], zum anderen die Versuchsgruppe „Gonazon®“ DG A, „Profact®“ und „juvenil“ [Datenanalyse II (DatA II)].

3.10.2.1 Datenanalyse I (DatA I)

Bei der Datenanalyse I fand primär die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) Anwendung. Ergab diese einen signifikanten Einfluss der Gruppe ($p \leq 0,05$), schloss sich der

paarweise Gruppenvergleich mittels Tukey-Test an. Lediglich bei schiefer Verteilung der Meßwerte kam anstelle von ANOVA der Kruskal-Wallis-Test zur Anwendung. Sofern dieser einen p -Wert $\leq 0,05$ aufwies, erfolgte zum paarweisen Gruppenvergleich der Dunn-Test (Bonferroni-Holm-Korrektur).

Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Expression des AR- oder des Ki-67-Antigens und dem Entwicklungstyp eines Tubulus seminiferus contortus [Tubulustyp (tt) a - tt d₂] der Versuchsgruppen „Gonazon®“ DG A bis DG C, vereinzelt auch der Versuchsgruppen „Gonazon®“ DG D und „Kontrolle adult“, wurde mithilfe nachfolgender statistischer Verfahren untersucht:

- Untersuchung ordinaler Zusammenhänge: Rangkorrelation nach Spearman
- Gruppenvergleich: Kruskal-Wallis-Test
- Ggf. zweidimensionale Häufigkeitsauszählung: Pearson-Chi-Quadrat-Test.

Im Hinblick auf die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung des aktivierte Caspase 3-Antigens erfolgte lediglich eine deskriptive Beurteilung.

3.10.2.2 Datenanalyse II (DatA II)

Bei der Datenanalyse II wurde entsprechend vorgegangen (ANOVA bzw. exakter Kruskal-Wallis-Test). Bei Reduktion der Gruppenzahl auf zwei (Entfall der Versuchsgruppe „juvenil“ aufgrund fehlender Spermatogonien) kam der t-Test bei ungleichen Varianzen der Vergleichsgruppen bzw. der exakte Wilcoxon-Mann-Whitney-Test zur Anwendung.

3.10.3 Signifikanzniveau

Bei der Beurteilung der statistischen Signifikanz wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ zugrunde gelegt. Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ wurden somit als statistisch signifikant und Ergebnisse $p > 0,05$ als statistisch nicht signifikant bewertet.

3.11 Fixierungen, Puffer und Lösungen

(Bezug und analytische Qualität siehe Kapitel 3.12)

3.11.1 Allgemein

Alkohol-Reihe:

Alkohol 30 %	Ethanol \geq 99,8 %	30,00 ml
	Aqua bidest	70,00 ml
Alkohol 50 %	Ethanol \geq 99,8 %	50,00 ml
	Aqua bidest	50,00 ml
Alkohol 60 %	Ethanol \geq 99,8 %	60,00 ml
	Aqua bidest	40,00 ml
Alkohol 70 %	Ethanol \geq 99,8 %	70,00 ml
	Aqua bidest	30,00 ml
Alkohol 80 %	Ethanol \geq 99,8 %	80,00 ml
	Aqua bidest	20,00 ml
Alkohol 95 %	Ethanol \geq 99,8 %	95,00 ml
	Aqua bidest	5,00 ml

Hämatoxylin-Lösung (1:1):

Hämatoxylin-Lösung modifiziert nach Gill III	100,00 ml
Aqua bidest	100,00 ml

3.11.2 Probengewinnung und -konservierung

Bouin'sche Lösung:

Picrinsäure (1,3 %)	15,00 ml
Formaldehydlösung (mind. 37 %)	5,00 ml
Essigsäure (100 %)	1,00 ml

Formol nach Lillie (\approx 4 %ige Phosphat-gepufferte Formaldehyd-Lösung) (pH 7,0):

Formaldehydlösung (mind. 37 %)	500,00 ml
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	20,00 g
Dinatriumhydrogenphosphat	32,50 g
Aqua bidest	4500,00 ml

Phosphatpuffer 0,1 M (pH 7,2):

Lösung A	Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	13,80 g
	Aqua bidest	ad 1000,00 ml
	Lagerung bei 4 °C	
Lösung B	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	17,80 g
	Aqua bidest	ad 1000,00 ml
	Lagerung bei 4 °C	
Gebrauchslösung	stets frisch ansetzen	
	Lösung A	28,30 ml
	Lösung B	71,70 ml

3.11.3 Histologie und Immunhistochemie

BSA-PBS-Puffer:

PBS-Puffer (1x)	100,00 ml
BSA	1,43 g
Triton X-100	30,00 μ l

BSA-Tris-HCl-Puffer:

Tris-HCl (2x)	100,00 ml
BSA	1,43 g
Triton X-100	30,00 µl

Citratpuffer 0,01 M (pH 6,0):

Lösung A	Citronensäure-Monohydrat	21,01 g
	Aqua bidest	1000,00 ml
	Lagerung bei 4 °C	
Lösung B	Trinatriumcitrat-Dihydrat	29,41 g
	Aqua bidest	1000,00 ml
	Lagerung bei 4 °C	
Gebrauchslösung	stets frisch ansetzen	
	Lösung A	9,00 ml
	Lösung B	41,00 ml
	Aqua bidest	450,00 ml

Eosin-Lösung 1 %:

Eosin gelblich	2,00 g
Aqua bidest	200,00 ml
Essigsäure	2 Tropfen

Genius III-Puffer:

Tris-HCl	1,52 g
TRIS PUFFERAN [®]	10,94 g
Natriumchlorid	5,84 g
Magnesiumchlorid	4,76 g
Aqua bidest	ad 1000 ml

3. Material und Methode

ICC-Puffer (pH 7,2 - 7,4):

Dinatriumhydrogenphosphat	1,20 g
Kaliumdihydrogenphosphat	0,20 g
Kaliumchlorid	0,20 g
Natriumchlorid	8,00 g
Aqua bidest	ad 1000,00 ml
Einstellung des pH 7,2 - 7,4	
Triton X-100	3,00 ml

PBS-Puffer (1x):

PBS-Puffer (5x)	200,00 ml
Aqua bidest	800,00 ml

PBS-Puffer (5x):

Natriumchlorid	41,00 g
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	13,80 g
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	11,00 g
Kaliumdihydrogenphosphat	2,75 g
Aqua bidest	ad 1000,00 ml

Pferdeserum:

Inaktivierung im Schüttelwasserbad bei 55 °C
für 30 min

Tris-HCl-Puffer 0,1 M (2x):

Tris-HCl-Puffer 1 M (20x)	100,00 ml
Aqua bidest	900,00 ml
Triton X-100	3,00 ml

Tris-HCl-Puffer 1 M (20x) (pH 7,6):

TRIS PUFFERAN®	121,14 g
Aqua bidest	800,00 ml
Einstellen des pH 7,6	
Aqua bidest	ad 1000,00 ml

Wasserstoffperoxid-Methanol-Lösung 3,0 %:

Wasserstoffperoxid (30 %ige Lösung)	6,00 ml
Methanol	54,00 ml

3.11.4 TUNEL**PBS-Puffer (1x):**

PBS (10x)	100,00 ml
Aqua bidest	900,00 ml

PBS-Puffer (10x):

Natriumchlorid	58,50 g
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	7,76 g
Dinatriumhydrogenphosphat	27,50 g
Aqua bidest	ad 500,00 ml

Proteinase K-Lösung:

Proteinase K	20 µg
PBS (1x)	1,00 ml

3.11.5 Proteinextraktion und Western Blot

Alkohol 0,1 %:

Ethanol $\geq 99,8\%$	0,10 ml
Aqua bidest	ad 100,00 ml

APS 10 %:

APS	0,10 g
Aqua bidest	ad 1,00 ml

Blocking-Puffer:

Magermilchpulver	5,00 g
Thimerosal-Lösung 2 %	1,00 ml
PBS (1x)	ad 100,00 ml

Bromphenolblau-Lösung:

Alkohol 0,1 %	2,00 ml
Bromphenolblau	gesättigt

Elektrodenpuffer (1x):

Rotiphorese [®] 10x SDS-PAGE	40,00 ml
Aqua bidest	ad 400,00 ml

PBS-Puffer (1x):

PBS (10x)	100,00 ml
Aqua bidest	ad 1000,00 ml

PBS-Puffer (10x):

Natriumchlorid	80,00 g
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	11,50 g
Kaliumchlorid	2,00 g
Kaliumdihydrogenphosphat	2,00 g
Aqua bidest	ad 1000,00 ml

PBST-Puffer 0,2 %:

Tween [®] 20	2,00 ml
PBS (1x)	ad 1000,00 ml

Ponceau-S-Arbeitslösung:

Ponceau-S-Stammlösung	1,00 ml
Aqua bidest	9,00 ml

Ponceau-S-Stammlösung:

Ponceau-S	2,00 g
Trichloressigsäure	30,00 g
5-Sulfosalicylsäure-Dihydrat	30,00 g
Aqua bidest	ad 100,00 ml

Probenauftragspuffer (3x):

Sammelgelpuffer	1,75 ml
Glycerin	1,50 ml
SDS-Stammlösung 10 %	5,00 ml
2-Mercaptoethanol	0,50 ml
Bromphenolblau-Lösung	1,25 ml

Protease-Inhibitor-Cocktail:

cOmplete Mini	1 Tablette
PBS (1x)	10,00 ml
Herstellung von 1 ml Aliquotierungen	
Lagerung bei 4 °C	

Sammelgelpuffer 0,5 M (pH 6,8):

TRIS PUFFERAN®	7,88 g
Aqua bidest	80,00 ml
Einstellung des pH 6,8	
Aqua bidest	ad 100,00 ml

SDS-Stammlösung 10 %:

SDS	10,00 g
Aqua bidest	ad 100,00 ml
Entgasung im Wasserstrahlvakuum	

Thimerosal-Lösung 2 %:

Thimerosal	2,00 g
Aqua bidest	ad 100,00 ml
Aufbewahrung lichtgeschützt bei 4 °C	

Transferpuffer (pH 8,2 - 8,4):

TRIS PUFFERAN®	3,03 g
Glycin	14,40 g
Methanol	100,00 ml
Aqua bidest	ad 1000,00 ml

Trenngelpuffer 1,5 M (pH 8,8):

TRIS PUFFERAN®	23,64 g
Aqua bidest	80,00 ml
Einstellung des pH 8,8	
Aqua bidest	ad 100,00 ml

3.11.6 RNA-Extraktion und PCR**DEPC-Wasser:**

DEPC	1,00 ml
Aqua bidest	1000,00 ml

EDTA 0,5 M (pH 8,0):

EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	37,22 g
Aqua bidest	160,00 ml
Einstellung des pH 8,0	
Aqua bidest	ad 200,00 ml

TBE-Puffer (1x):

TBE-Puffer (10x)	100,00 ml
Aqua bidest	900,00 ml

TBE-Puffer (10x):

TRIS PUFFERAN®	108,00 g
Borsäure	55,00 g
EDTA 0,5 M	40,00 ml
Aqua bidest	ad 1000,00 ml

3. Material und Methode

TE-Puffer (pH 8,0):

TRIS PUFFERAN®	1,21 g
EDTA 0,5 M	2,00 ml
Aqua bidest	ad 1000,00 ml
Einstellung des pH 8,0	
anschließend autoklavieren	

3.12 Reagentien und Chemikalien (Hersteller/Lieferant)

Acrylamide, for molecular biology, minimum 99 %

(SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim)

AEC SUBSTRATE KIT FOR PEROXIDASE SK-4200

(Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA)

Agarose, ultra pure, electrophoresis grade

(GibcoBRL, Life Technologie, Karlsruhe)

AmpliTaq Gold® 5 U/µl

(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit S7100

(CHEMICON® International, Inc., Temecula, CA, USA)

APS (Ammoniumperoxodisulfat) $\geq 98\%$, p.a., ACS

(Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe)

Assistent-Histokitt 1025/250

(Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co.KG, Sondheim)

Avidin/Biotin Blocking Kit SP-2001

(Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA)

BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate), 4-toluidine salt Solution

(Roche Diagnostics GmbH, Penzberg)

Borsäure $\geq 99,8\%$, p.a., ACS, ISO

(Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe)

Bromphenolblau (3',3'',5',5''-Tetrabromphenolsulfonphthalein)

(SIGMA CHEMIE COMPANY, St Louis, MO, USA)

BSA (Bovines Serumalbumin), 98 %, Elektrophorese

(SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim)

1-Butanol $\geq 99,5\%$, zur Synthese

(Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe)

Chloroform (Trichlormethan) ROTISOLV®, HPLC

(SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim)

3. Material und Methode

Citronensäure-Monohydrat, krist. reinst

(Merck KGaA, Darmstadt)

cOmplete, Mini, EDTA-free Protease-Inhibitor-Cocktail

(Roche Diagnostics GmbH, Penzberg)

DAB Peroxidase Substrate Kit SK-4100

(Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA)

DEPC (Diethyl pyrocarbonate), approx. 97 %, NMR

(SIGMA CHEMICAL COMPANY, St Louis, MO, USA)

Dinatriumhydrogenphosphat, (etwa 98 %) reinst

(E. Merck, Darmstadt)

Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, purum p.a., $\geq 98,0\%$ (T)

(SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim)

DNase I recombinant, RNase-free 10 U/ μ l

(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)-Disodium Salt, for molecular biology, 0,5 M

(SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim)

Eosin gelblich, Indikator und für die Mikroskopie

(E. Merck, Darmstadt)

Essigsäure, 100 %, wasserfrei

(Merck KGaA, Darmstadt)

Ethanol, $\geq 99,8\%$, DAB, reinst

(Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe)

Ethidium bromide solution for molecular biology, 10 mg/ml in H₂O

(SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim)

Formaldehydlösung, mind. 37 %, stabilisiert mit etwa 10 % Methanol

(Merck, KGaA, Darmstadt)

GeneAmp[®] Gold RNA PCR Core Kit

(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

GeneRuler[™] 100 bp PLUS DNA Ladder (0,5 μ g/ μ l)

(Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)

Glycerin ROTIPURAN® $\geq 99,5\%$, wasserfrei

(Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe)

Glycin $\geq 99\%$, p.a.

(Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe)

Hämatoxylin-Lösung modifiziert nach Gill III für die Mikroskopie

(Merck KGaA, Darmstadt)

iQ™ Supermix for qPCR

(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)

Kaisers Glyceringelatine für die Mikroskopie (enthält Phenol)

(Merck KGaA, Darmstadt)

Kaliumchlorid, zur Analyse

(E. Merck, Darmstadt)

Kaliumdihydrogenphosphat, $\geq 99,0\%$, ACS

(SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim)

6x **L**oading Dye Solution

(Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)

Magermilchpulver, Instant, Sprühgetrocknet

(J. M. Gabler Saliter GmbH & Co.KG, Obergünzburg/Allgäu)

Magnesiumchlorid

(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

2-Mercaptoethanol

(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

Methanol, reinst

(Merck KGaA, Darmstadt)

MultiScribe™ Reverse Transcriptase 50 U/μl

(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

Natriumchlorid, zur Analyse, ACS, ISO

(Merck KGaA, Darmstadt)

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, zur Analyse

(Merck KGaA, Darmstadt)

Natronlauge, 2 N

(Merck KGaA, Darmstadt)

NBT (Nitroblue tetrazolium chloride) Solution

(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10,0 - 170,0 kDa

(Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)

Pferdeserum

(eigene Herstellung; siehe Kapitel 3.11.3)

Picric Acid-Saturated Solution, 1,3 %

(SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim)

Ponceau-S

(Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe)

Potassium phosphate monobasic, ACS reagen, $\geq 99,0\%$

(SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim)

Prestained Molecular Weight Standard Mixture (for SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis) SDS-7B, 31,5 - 172,0 kDa

(SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim)

2-Propanol ROTIPURAN® $\geq 99,8\%$, p.a., ACS, ISO

(Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe)

Proteinase K

(SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Deisenhofen)

QIAEX II Gel Extraction Kit

(QIAGEN GmbH, Hilden)

RiboLock™ RNase Inhibitor, 40 U/μl

(Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)

RNAlater® Tissue Collection: RNA Stabilization Solution

(Applied Biosystems/Ambion, Austin, USA)

Rotiphorese® Gel 30

(Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe)

Rotiphorese® 10x SDS-PAGE, 10fach konz. Laufpuffer für die Gelelektrophorese

(Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe)

Salzsäure rauchend 37 %, purum p.a.

(Fluka Chemika, SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim)

SDS (Sodiumdodecylsulfat) ultra pure, $\geq 99\%$, f. d. Elektrophorese

(Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe)

5-Sulfosalicylsäure-Dihydrat, purum p.a., $\geq 98\%$ (T)

(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

T*aqMan*[®] *qPCR Mastermix*

(Eurogentec, Seraing, Belgien)

TEMED, 99 %, p.a., f. d. Elektrophorese

(Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe)

THIMEROSAL approx. 98 % (HPLC)

(SIGMA-ALDRICH[®] Chemie GmbH, Deisenhofen)

Trichloressigsäure, purum p.a., $\geq 99\%$ (T)

(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

Trinatriumcitrat-Dihydrat (Sodium citrate tribasic dihydrate), ACS reagent, $\geq 99,0\%$

(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

TRIS (Trishydroxymethylaminomethan) PUFFERAN[®], Ultra Qualität, $\geq 99,9\%$,

Buffer Grade

(Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe)

TRIS-HCl

(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

Triton[®] X-100, rein

(Serva FEINBIOCHEMICA, Heidelberg/New York)

TRIzol[®] Reagent

(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA)

Tween[®]20, Sigma Ultra

(SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim)

VECTASTAIN[®] *Elite* ABC Kit (Rabbit IgG) PK-6101

(Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA)

VECTOR[®] NovaREDTM Peroxidase Substrate Kit SK-4800

(Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA)

Wasserstoffperoxid 30 %, medizinisch reinst, stabilisiert
(Merck KGaA, Darmstadt)

Xylol zur Synthese
(Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn)

3.13 Verbrauchsmaterialien (Hersteller/Lieferant)

Adhäsions-Objektträger SUPERFROST® PLUS
(Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig)

Alu-Laborfolie 0,030 mm x 300 mm x 100 m
(MAGV, Rabendorf-Londorf)

Dako Pen
(Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark)

Deckgläser für die Mikroskopie
(Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co.KG, Braunschweig)

Filterkarton Mini Trans-Blot® Filter Paper
(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)

Filterpapier Paper Sheets (Qual.) Grade: 1/F 80 g/m³ 200 x 250 mm
(MUNKTELL & FILTRAK GmbH, Bärenstein)

Filterspitzen SafeSeal-Tips, gestopfte Pipettenspitzen, RNase-/DNase-/pyrogenfrei
(Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf)

Latexhandschuhe UNIGLOVES® Comfort, gepudert, unsteril
(UNIGLOVES® Arzt- und Klinikbedarf Handelsgesellschaft mbH, Troisdorf)

Microscopy Immersionsöl nach DIN 58884 für die Mikroskopie
(MERCK KGaA, Darmstadt)

Mikrotomklingen DB 80 L
(Leica Instruments GmbH, Nussloch)

Mikrotomklingen Leica 819
(Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch)

Nitrilhandschuhe NITRILE GLOVES N-DEX®, puderfrei
(Best Manufacturing Company, Menlo, GA, USA)

Optische Folie PCR Sealers™ Microseal® 'B' Film

(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)

PARAFILM „M“ Laboratory Film

(American National Can Company, Menasha, WI, USA)

Pipettenspitzen ohne Filter 10 µl, farblos

(SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht)

Pipettenspitzen PP natur, mit Filter, 0,5 - 10 µl, 1 - 200 µl, 100 - 1000 µl, RNase-, DNA- und Pyrogen-frei, steril

(nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe)

Pipettenspitzen ratiolab® gelb (1 - 200 µl), blau (200 - 1000 µl)

(ratiolab GmbH, Dreieich)

Präzisionswischtücher KIMTECH Science Precision Wipes

(Kimberly-Clark Europe Limited/Professional Sector, Reigate, Surrey, UK)

Probenröhre mit rundem Boden (4,5 ml, 75,0 x 13,0 mm, PP), Eindrückstopfen, Präparierung: Plasma Lithium-Heparin

(SARSTEDT Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht)

PVDF-Membran Immobilon®-P Transfer Membrane

(Millipore Corporation, Bedford, MA, USA)

Reagenz- und Zentrifugenröhre mit rundem Boden (3,5 ml, 55 x 12 mm, PP), Eindrückstopfen

(SARSTEDT Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht)

2,0 ml-Reaktionsgefäß mit Druckverschluss, DNA-/DNase-/RNase- und pyrogenfrei

(Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf)

0,5 ml-Reaktionsgefäß PCR-SOFTTUBES mit Flachdeckel, DNA-/DNase-/RNase-frei

(Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf)

RNase AWAY®

(Molecular BioProducts, Inc., San Diego, USA)

50 ml-Röhrchen CELLSTAR® PP-Testtubes, 50 ml

(greiner bio-one, Frickenhausen)

15 ml-Röhrchen Nunc™ Disposal Conical Tubes

(Nalge Nunc International, Rochester, USA)

Schwammtücher OPTIWISCH®

(ALDI Einkauf GmbH & Co. oHG, Mülheim an der Ruhr)

Skalpellklinge Typ 22, steril

(Aesculap AG, Tuttlingen)

Thermo-Fast 96 Skirted PCR Plate AB-0800-L, ABgene® PCR Plates

(Thermo Fisher Scientific GmbH, Langenselbold)

UVette®, Einwegküvette für Spektralphotometrische Analysen, 220 - 1600 nm

(Eppendorf AG, Hamburg)

3.14 Angewandte Gerätschaften (Hersteller/Lieferant)

Autoklav Tuttnauer systec 3850 ELC

(Systec GmbH Labor-Systemtechnik, Wettenberg)

Biometra® T1 Thermocycler 48

(Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen)

Blot-Apparatur Mini Trans-Blot® Cell

(Bio-Rad Laboratories GmbH, München)

CFX96™ Real-Time PCR Detection System

(BIO-RAD Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)

Digitale Kompaktkamera IXUS

(Canon Deutschland GmbH, Krefeld)

Digitalkamera Leica DC300

(Leica Microsystems Ltd., Heerbrugg, CH)

Durchlichtmikroskop Leitz DMRM

(Leica Mikroskopie&Systeme GmbH, Wetzlar)

Einbettautomat Leica TISSUE PROCESSOR TP 1050

(Leica Microsystems, Wetzlar)

Elektrophoresekammer EasyPhor Medi inklusive Gelträger 15 x 10 cm, Kamm und Gießdichtung

(Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf)

Elektrophoresekammer Hoefer[®] Mighty Small II SE250/260

(Hoefer, Inc., San Francisco, CA, USA)

Eppendorf[®] BioPhotometer[®]

(Eppendorf AG, Hamburg)

Färbekasten mit Falzdeckel und Färberahmen, aus Glas, inkl. Drahtbügel

(Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & CoKG - Assistent, Sondheim/Rhön)

Feuchte Kammer, Frischhaltebox

(Curver, Niedercorn, Luxemburg)

Gefrierschrank

(Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen)

Gießvorrichtung Hoefer[®] Mighty Small SE245 DUAL GEL CASTER mit Glasplatten

Hoefer[®] Rectangular Glass Plates 10 x 10 cm SE262P-5

(Hoefer, Inc., San Francisco, CA, USA)

Heizmagnetrührer IKA-COMBIMAG RET

(IKA-Werk, Staufen im Breisgau)

Heizplatte HB110

(Harry Gestigkeit GmbH, Düsseldorf)

Heizplatte Schott CK 112

(SCHOTT-Geräte GmbH, Hofheim a. TS)

IKA-ULTRA-TURRAX[®] T8 mit Dispergierwerkzeug S8N-5G

(IKA[®]-Werke GmbH&Co.KG, Staufen)

IKA-ULTRA-TURRAX[®] T10 basic mit Dispergierwerkzeug S10N-5G

(IKA[®]-Werke GmbH&Co.KG, Staufen)

Kombischüttler KL 2

(Edmund Bühler Laborgerätebau, Glastechnik, Umwelttechnik, Tübingen)

Kühlschrank

(Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen)

Labor-Spülautomat G 7783 MIELABOR mit Aqua-Purificator G 7795 und

Leitwertmeß- modul C und DOS-Module C20 und C60

(Miele & Cie. KG, Gütersloh)

Magnetstäbchen Rotilao®

(Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe)

Mikrowellengerät Compact Y50

(Moulinex GmbH, Solingen)

Mineralight® Lamp UVGL-25

(UVP-Inc., San Gabriel, CA, USA)

Netzgerät Electrophoresis Power Supply - EPS 301

(Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg)

Netzgerät Power Supply 2301 Macrodrive 1

(LKB Bromma, Golden, USA)

Paraffinausgießstation Leica EG 1160

(Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch)

Paraffin-Streckbad GFL 1052

(Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel)

pH-Meter inoLab® pH Level 1 mit pH-Elektrode Sen Tix 21 und Temperaturfühler
TFK 325

(WTW Wissenschaftlich Technische Werkstätten, Weilheim)

Pipette Eppendorf Reference® 0,5 - 10,0 µl, 2,0 - 20,0 µl, 10,0 - 100,0 µl, 100,0 - 1000,0 µl

(Eppendorf AG, Hamburg)

Plattformschüttler Heidolph Polymax 1040

(Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach)

Präparatekasten, antistatisch

(Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co.KG - Assistent, Sondheim/Rhön)

Reagenzglasschüttler Heidolph REAX control

(Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach)

Reibeschale und Pistill aus glasiertem Porzellan, Reibflächen rau (unglasiert)

(Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe)

Rotationsmikrotom Leica RM2125 RT

(Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch)

Schlittenmikrotom

(Reichert Jung AG, Heidelberg)

Schüttelwasserbad GFL 1083

(Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedelf)

Tauchzirkulator THERMOMIX 1419

(B. Braun Melsungen AG, Melsungen)

Tiefkühlschrank HFU 686 Basic

(Kendro Laboratory Products, Hanau)

Ultraschallgerät petScope30

(KRANZBÜHLER Medizinische Systeme, Solingen)

Ultraschallgerät SonoAce 9900 (SA9900)

(KRETZ TECHNIK AG, Zipf, Österreich)

UV-Transilluminator Image Master

(Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK)

Vakuumpumpe, KNF Neuberger Pumpen-Typ No. 035.12AN18

(KNF Neuberger, Freiburg)

Waage Mettler AE160 und Mettler PJ300

(Mettler-Toledo, Giessen)

Wärmeschrank Memmert Typ B 26 und Memmert UL 80

(Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach)

Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q[®] Biocel

(MILLIPORE GmbH, Eschborn)

Zentrifuge HERAEUS SEPATECH Labofuge[®] 200

(Kendro Laboratory Products International Sales, Hanau)

Zentrifuge Hettich Micro 22R

(Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen)

3.15 Programme und Software

BLAST Basic Local Alignment Search Tool (Hilfsprogramm zur Sequenzanalyse)

(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/; *freeware*; Stand 02.01.2015)

BMDP/Dynamics Release 8.1 (Programmpaket zur statistischen Auswertung)

(Statistical Solutions Ltd., Cork, Irland)

CFX ManagerTM Software Version 1.0 (Programm zur Einstellung und Auswertung von RT-qPCR-Experimenten)

(BIO-RAD Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)

Chromas LITE Version 2.01 (Software zur DNA-Sequenzierung)

(<http://www.technelysium.com.au/>; *freeware*; Stand 02.01.2015)

JabRef 2.4.2 (Literaturverwaltung)

(<http://www.sourceforge.net/projects/jabref/files/jabref/2.4.2/>;
freeware; Stand 02.01.2015)

Leica Image Manager IM1000, Version 1.20 (Programm zum Bild- und Datenmanagement)

(Leica Microsystems, Wetzlar)

Oligo Analyzer 1.0.2/Oligo Explorer 1.1.0 (Software zum Design von Primern)

(Teemu Kuulasmaa, University of Kuopio, Kuopio, Finnland; *freeware*)

StatXact Version 9.0.0 (Programmpaket zur statistischen Auswertung)

(CYTEL Inc., Cambridge, MA, USA)

Texmaker 3.5.2 (\LaTeX Editor)

(<http://www.xmlmath.net/texmaker/>; *freeware*; Stand 02.01.2015)

The Mac \TeX -2012 Distribution (\LaTeX Textsatzsystem)

(<http://www.tug.org/mactex/2012/>; *freeware*; Stand 02.01.2015)

4 Ergebnisse

4.1 Tubuli seminiferi contorti

4.1.1 Zuordnung nach dem Stand der Spermatogenese

4.1.1.1 Versuchsgruppe „Gonazon®“

Die Zuordnung der Hunde in die Gruppen Developmental Group (DG) A bis DG D (siehe Tabelle 4.1) erfolgte wie in Kapitel 3.4.1.1 beschrieben. Die sich daraus ergebenden Gruppen wiesen eine Größe von 3 bis 17 Tieren auf.

Tabelle 4.1: Zuordnung der Hunde der Versuchsgruppe „Gonazon®“ in die Developmental Group (DG) A - DG D

DG	Anzahl	Hunde
A	4	Elias, Percy, Luca, Nick
B	3	LeoB, Joni, TheoH
C	6	Speedy, Spikey, Snoopy, Strolch, LeoS, Mortimer
D	17	Bruno, JoschiF, Shy, Captain Kirk, Elliott, Kaspar, Berry, Monty, Bobby, Lucky, Lex, Pawlow, Feivel, Bogus, TheoJ, JoschiP, Sydney

4.1.1.1.1 Gruppen DG A, DG B und DG C Alle den Gruppen DG A, DG B und DG C zugeordneten Hunde befanden sich 0 bis 9 Wochen nach Entfernung des GnRH-Implantates und wiesen eine unvollständige Spermatogenese auf. Im Gegensatz zu den weitgehend „massiv“ erscheinenden Tubuli seminiferi contorti der in Woche 0 kastrierten Rüden (Percy, Luca, Nick) der Gruppe DG A, lassen die Samenkanälchen der in ihrer Entwicklung weiter fortgeschrittenen Gruppen DG B und DG C ein ausgebildetes Tubuluslumen erkennen. Die zelluläre Entwicklung innerhalb der in Rekrudescenz befindlichen Tubuli seminiferi contorti (siehe Tabelle 3.4, Seite 59) ist entsprechend dem Auftreten der Tubulustypen (tt) a, tt b, tt c₁₋₃ und tt d₁₋₂ in Abbildung 4.1 sowie Tabelle 4.2 dargestellt.

Während die Tiere der Gruppe DG A vornehmlich den Tubulustyp tt a ($70,38 \pm 19,98\%$) sowie tt b ($29,63 \pm 19,98\%$) aufwiesen, zeigten Rüden der Gruppe DG B neben dem überwiegend vertretenen Tubulustyp tt b ($63,08 \pm 13,00\%$) auch die Tubulustypen tt a und tt c₁₋₃ in annähernd gleichen Anteilen. Bei Hunden der Gruppe DG C lag der prozentuale Anteil des Tubulustyp tt a bei nur noch $4,54 \pm 8,57\%$. Der mittlere Anteil der Tubulustypen tt b, tt c₁ bis tt c₃, tt d₁ und tt d₂ lag zwischen $32,25\%$ und $6,67\%$, wobei sich die Variationskoeffizienten (VK) in einem Bereich von circa 57% bis 110% bewegten.

Tabelle 4.2: Prozentuale Verteilung (%) der Tubuli seminiferi contorti nach Tubulustyp (tt) a - tt d₂ der Versuchsgruppe „Gonazon[®]“ (DG A - DG C) [$\bar{x} \pm \text{SD}$; VK (Variationskoeffizient); tt a: ausschließlich Spermatogonien (Spg); tt b: Spg bis Spermatozyten; tt c₁ / tt c₂ / tt c₃: Spg bis unterschiedlich entwickelte runde Spermatozyten; tt d₁ / tt d₂: Spg bis unterschiedlich entwickelte elongierende Spermatozyten]

DG	Hund	tt (%)							
		a	b	c ₁₋₃	(c ₁)	(c ₂)	(c ₃)	d ₁₋₂	(d ₁) (d ₂)
A	Elias	98,75	1,25	-	(-)	(-)	(-)	-	(-) (-)
	Percy	70,00	30,00	-	(-)	(-)	(-)	-	(-) (-)
	Luca	56,50	43,50	-	(-)	(-)	(-)	-	(-) (-)
	Nick	56,25	43,75	-	(-)	(-)	(-)	-	(-) (-)
	\bar{x}	70,38	29,63	-	(-)	(-)	(-)	-	(-) (-)
	SD	19,98	19,98	-	(-)	(-)	(-)	-	(-) (-)
	VK	28,39	67,43	-	(-)	(-)	(-)	-	(-) (-)
B	LeoB	35,50	50,25	14,25	(7,75)	(4,50)	(2,00)	-	(-) (-)
	Joni	7,00	76,25	16,75	(7,00)	(4,75)	(5,00)	-	(-) (-)
	TheoH	10,00	62,75	27,25	(22,25)	(3,50)	(1,50)	-	(-) (-)
	\bar{x}	17,50	63,08	19,42	(12,33)	(4,25)	(2,83)	-	(-) (-)
	SD	15,66	13,00	6,90	(8,60)	(0,66)	(1,89)	-	(-) (-)
	VK	89,49	20,61	35,53	(69,70)	(15,56)	(66,81)	-	(-) (-)
C	Speedy	21,75	62,75	14,25	(6,75)	(5,25)	(2,25)	1,25	(1,25) (0,00)
	Spikey	0,00	48,75	48,00	(32,50)	(12,25)	(3,25)	3,25	(2,00) (1,25)
	Snoopy	4,00	50,25	39,00	(13,25)	(8,75)	(17,00)	6,75	(1,25) (5,50)
	Strolch	0,25	19,00	42,50	(6,25)	(13,75)	(22,50)	38,25	(14,00) (24,25)
	LeoS	1,25	9,25	39,75	(8,50)	(4,75)	(26,50)	49,75	(15,00) (34,75)
	Mortimer	0,00	3,50	34,50	(2,50)	(2,50)	(29,50)	62,00	(6,50) (55,50)
	\bar{x}	4,54	32,25	36,33	(11,63)	(7,88)	(16,83)	26,88	(6,67) (20,21)
	SD	8,57	24,73	11,70	(10,81)	(4,47)	(11,69)	26,48	(6,38) (22,17)
	VK	188,62	76,68	32,19	(92,97)	(56,78)	(69,44)	98,53	(95,74) (109,70)

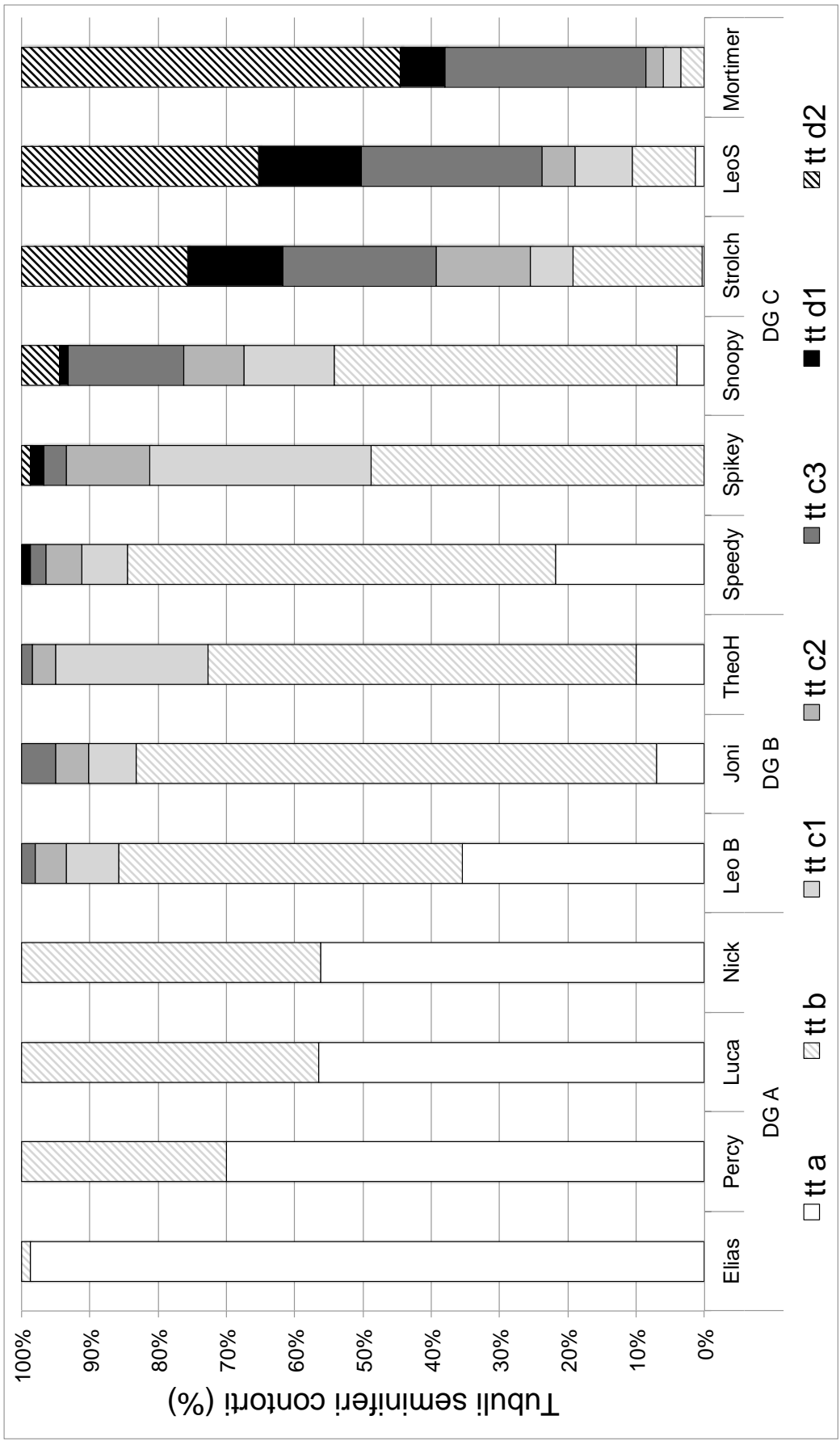


Abbildung 4.1: Prozentuale Verteilung (%) der Tubuli seminiferi contorti nach Tubulustyp (tt) a - tt d₂ der Versuchsgruppe „Gonazon®“ (DG A - DG C) [tt a: ausschließlich Spermatogonien (Spg); tt b: Spg bis Spermatozyten; tt c₁ / tt c₂ / tt c₃: Spg bis unterschiedlich entwickelte runde Spermatiden; tt d₁ / tt d₂: Spg bis unterschiedlich entwickelte elongierende Spermatiden]

4.1.1.1.2 Gruppe DG D Bei den Rüden der Gruppe DG D lag die Explantation des GnRH-Analogons mindestens 9 Wochen zurück. Alle Tiere wiesen eine vollständige Spermatogenese auf, sodass die Klassifikation der Tubuli seminiferi contorti entsprechend des in Kapitel 3.4.1.1 beschriebenen modifizierten Staging nach RUSSELL et al. (1990b) erfolgte. Jedoch zeigten im Mittel $1,40 \pm 1,48\%$ der bei 15 der 17 Rüden beobachteten Samenkanälchen ein den Tubulustypen (tt a, tt b, tt c₁₋₃ sowie tt d₁₋₂) entsprechendes Erscheinungsbild. Eine Übersicht über die beobachteten Tubulustypen (tt)_{a-d2} und Stages (S) I, S II-IV, S V, S VI, S VII geben Tabelle 4.3 bzw. Abbildung 4.2.

Die bei den einzelnen Rüden der Gruppe DG D beobachtete prozentuale Verteilung der verschiedenen Entwicklungsstadien SI bis SVIII der Tubuli seminiferi contorti zeigte ein relativ einheitliches Erscheinungsbild; die VK lagen zwischen circa 18% (SI) und 49% (SVIII). Das mittlere prozentuale Vorkommen eines jeden Stages SI, S II-IV, S V, S VI, S VII und SVIII entsprach annähernd dem der Versuchsgruppe „Kontrolle adult“ (siehe Tabelle 4.4).

Aufgrund dieses, ein sehr einheitliches Bild zeigenden Ergebnisses, erfolgte – mit Ausnahme der hormonanalytischen Auswertungen der peripheren Testosteronkonzentration (siehe Kapitel 4.5.1) – für alle nachfolgenden Untersuchungen eine Reduzierung der Gruppengröße von DG D auf fünf Rüden. Bei den nach dem Zufallsprinzip ausgewählten Hunden handelt sich um die Rüden Berry, Bruno, Feivel, Shy und Sidney.

Tabelle 4.3: Prozentuale Verteilung (%) der Tubuli seminiferi contorti nach Tubulustyp (tt)_{a-d₂} und Stage (S) I-S VIII der Versuchsgruppe „Gonazon®“ (DG D) [$\bar{x} \pm SD$; VK (Variationskoeffizient); tt_{a-d₂}: Spermatogonien bis elongierende Spermatiden; S I-S VIII: modifiziertes Staging nach RUSSELL et al. (1990b)]

Hund	tt (%)	S (%)					
	a - d ₂	I	II-IV	V	VI	VII	VIII
Bruno	3,50	21,50	17,00	18,00	9,75	21,75	8,50
JoschiF	3,50	29,75	22,50	18,25	12,75	9,75	3,50
Shy	0,25	25,75	20,50	22,75	12,50	13,50	4,75
Captain Kirk	0,25	26,50	19,00	12,75	13,00	24,50	4,00
Elliott	5,25	29,75	25,25	18,50	8,00	11,75	1,50
Kaspar	0,00	28,00	21,00	16,75	12,50	17,25	4,50
Berry	0,75	26,50	28,00	16,50	14,00	12,00	2,25
Monty	0,00	34,00	26,50	13,50	12,75	12,25	1,00
Bobby	0,20	18,75	33,75	21,50	10,00	12,25	3,50
Lucky	1,50	31,50	25,75	15,70	10,75	11,75	3,00
Lex	0,50	30,00	26,50	22,00	7,75	11,25	2,00
Pawlow	1,50	29,25	13,50	23,25	16,50	12,25	3,75
Feivel	1,75	40,50	20,25	9,75	10,25	13,00	4,50
Bogus	2,00	28,00	22,00	20,25	6,50	16,50	4,75
TheoJ	0,50	30,50	30,50	17,75	4,75	12,75	3,25
JoschiP	0,50	29,00	18,75	27,75	7,75	11,50	4,75
Sydney	1,75	38,25	31,75	11,75	7,75	7,25	1,50
\bar{x}	1,40	29,26	23,68	18,04	10,43	13,60	3,59
SD	1,48	5,24	5,49	4,63	3,08	4,24	1,77
VK	105,88	17,89	23,18	25,65	29,51	31,19	49,39

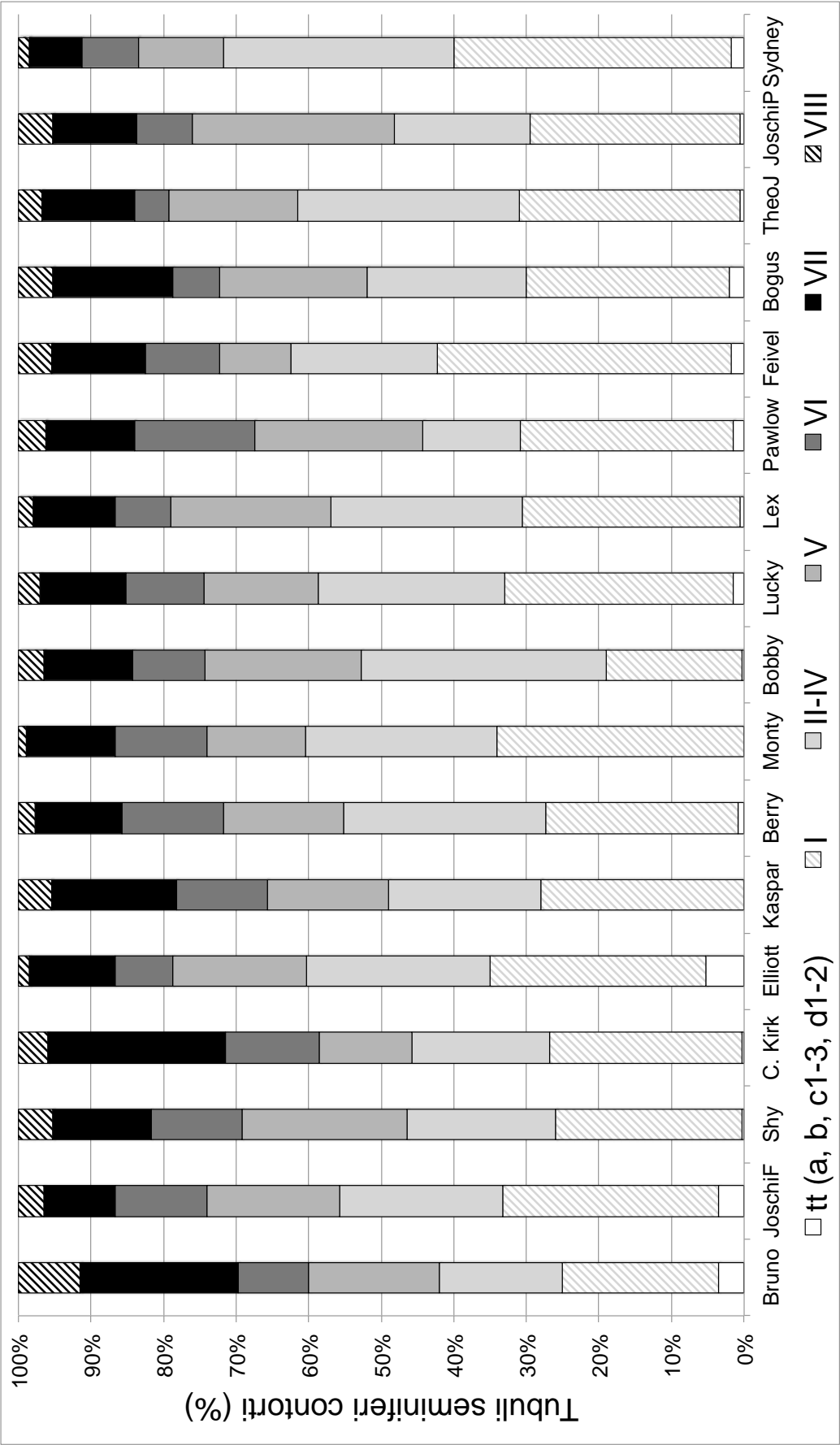


Abbildung 4.2: Prozentuale Verteilung (%) der Tubuli seminiferi contorti nach Tubulustyp (tt) _{a-d₂} und Stage (S) I-S VIII der Versuchsgruppe „Gonazon®“ (DGD) [tt _{a-d₂}: Spermatogonien bis elongierende Spermatiden; SI-SVIII: modifiziertes Staging nach RUSSELL et al. (1990b)]

4.1.1.2 Versuchsgruppe „Kontrolle adult“

Alle Rüden der Versuchsgruppe „Kontrolle adult“ wiesen eine vollständige Spermatogenese auf, wobei sich bei 4 der 5 Tiere zudem vereinzelt Samenkanälchen der Tubulustypen tt a bis tt d₂ zeigten. Der Anteil an Tubuli seminiferi contorti des Tubulustyp tt (a – d₂) betrug im Mittel $2,95 \pm 3,07\%$. Einen Überblick über die prozentuale Verteilung der pro Hund erfassten 200 Tubuli seminiferi contorti geben Tabelle 4.4 und Abbildung 4.3.

Tabelle 4.4: Prozentuale Verteilung (%) der Tubuli seminiferi contorti nach Tubulustyp (tt)_{a – d₂} und Stage (S) I- S VIII der Versuchsgruppe „Kontrolle adult“ [$\bar{x} \pm \text{SD}$; VK (Variationskoeffizient); tt_{a – d₂}: Spermatogonien bis elongierende Spermatiden; SI-S VIII: modifiziertes Staging nach RUSSELL et al. (1990b)]

Hund	tt (%)	S (%)					
	a - d ₂	I	II-IV	V	VI	VII	VIII
Ben	0,00	29,50	22,50	18,00	12,25	14,75	3,00
Charlie	1,00	36,75	33,25	11,75	10,25	5,25	1,75
Horst	5,75	24,75	27,50	15,00	11,25	12,50	3,25
Soto	6,75	25,50	34,50	13,00	8,50	10,50	1,25
Tom	1,25	29,25	21,50	19,00	12,75	12,25	4,00
\bar{x}	2,95	29,15	27,85	15,35	11,00	11,05	2,65
SD	3,07	4,76	5,97	3,12	1,70	3,58	1,13
VK	104,03	16,32	21,43	20,33	15,41	32,37	42,51

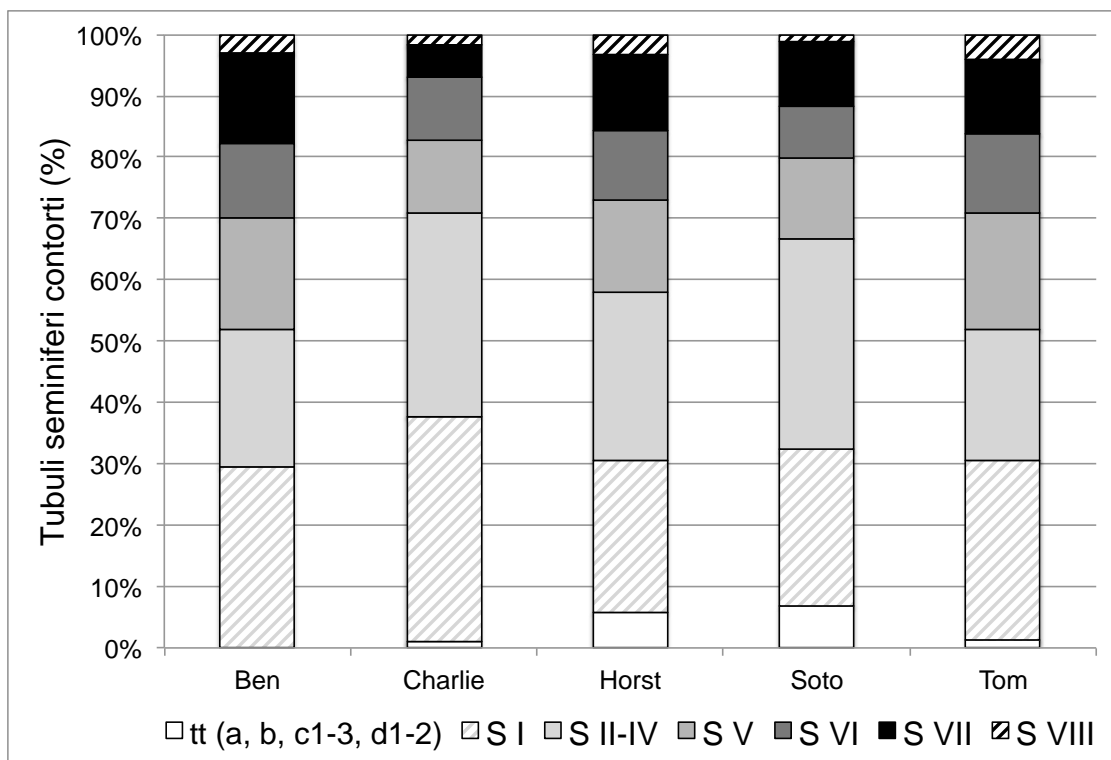


Abbildung 4.3: Prozentuale Verteilung (%) der Tubuli seminiferi contorti nach Tubulustyp (tt)_{a–d₂} und Stage (S) I–S VIII der Versuchsgruppe „Kontrolle adult“ [tt_{a–d₂}: Spermatogonien bis elongierende Spermatiden; SI–S VIII: modifiziertes Staging nach RUSSELL et al. (1990b)]

4.1.1.3 Versuchsgruppe „Profact®“

Der tubuläre Entwicklungsstand der Hunde der Versuchsgruppe „Profact®“ entsprach weitestgehend dem der Versuchsgruppe „Gonazon®“ Gruppe DG A; ein tubuläres Lumen war nicht mehr vorhanden (siehe Abbildung 4.4).

Wie aus Tabelle 4.5 ersichtlich, erfolgte lediglich bei einem Rüden dieser Versuchsgruppe mit einem Anteil von 0,5 % die Identifizierung eines einzelnen Samenkanälchen des Tubulustyps tt_{c₁}. Der mittlere prozentuale Anteil der Tubulustypen tt_a und tt_b lag bei $64,33 \pm 28,62 \%$ bzw. $35,50 \pm 28,40 \%$ und entsprach somit weitgehend dem der Gruppe DG A (siehe Tabelle 4.2).

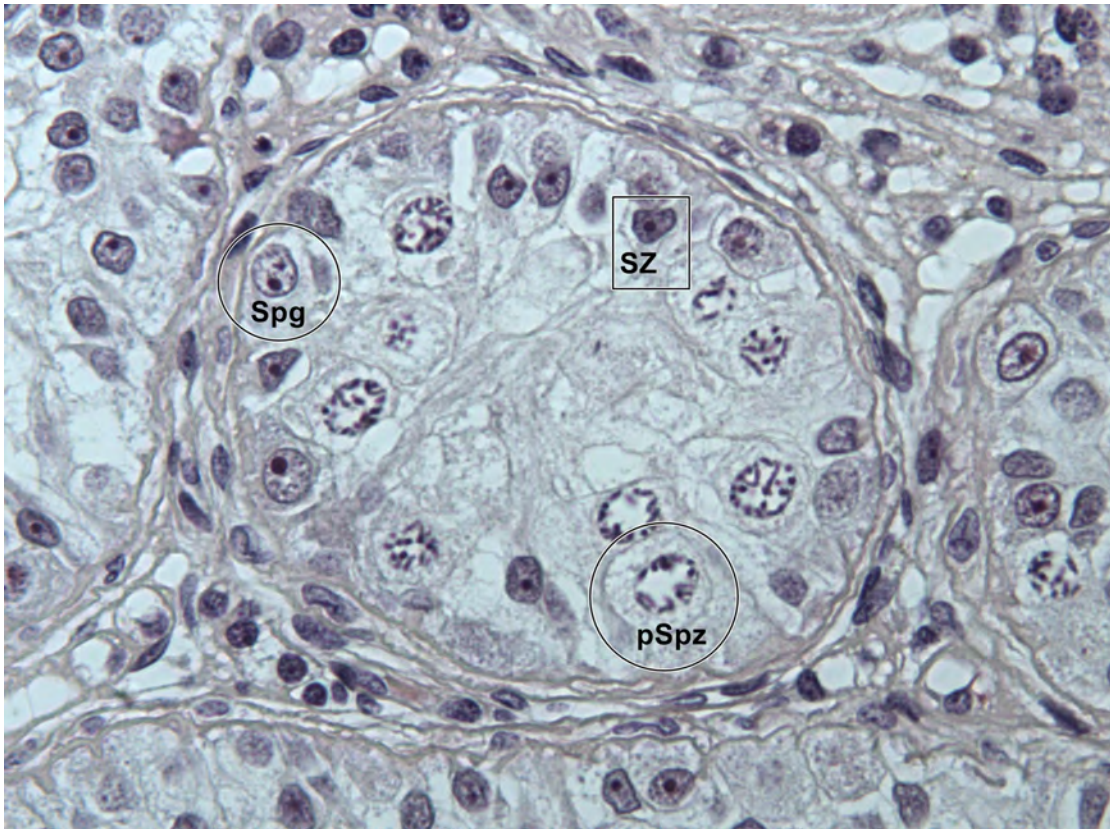


Abbildung 4.4: Tubulus seminiferus contortus der Versuchsgruppe „Profact®“ (400 x)
[SZ (Sertolizelle), Spg (Spermatogonie), pSpz (primäre Spermatozyte)]

Tabelle 4.5: Prozentuale Verteilung (%) der Tubuli seminiferi contorti nach Tubulustyp tt a - tt d₂ der Versuchsgruppe „Profact®“ [$\bar{x} \pm SD$; VK (Variationskoeffizient); tt a: ausschließlich Spermatogonien (Spg); tt b: Spg bis Spermatozyten; tt c₁ / tt c₂ / tt c₃: Spg bis unterschiedlich entwickelte runde Spermatisden; tt d₁ / tt d₂: Spg bis unterschiedlich entwickelte elongierende Spermatisden]

Hund	tt (%)								
	a	b	c ₁₋₃	(c ₁)	(c ₂)	(c ₃)	d ₁₋₂	(d ₁)	(d ₂)
HansiT	95,75	4,25	0,00	(0,00)	(-)	(-)	-	(-)	(-)
SidT	57,50	42,50	0,00	(0,00)	(-)	(-)	-	(-)	(-)
FlohG	39,75	59,75	0,50	(0,50)	(-)	(-)	-	(-)	(-)
\bar{x}	64,33	35,50	0,17	(0,17)	(-)	(-)	-	(-)	(-)
SD	28,62	28,40	0,29	(0,29)	(-)	(-)	-	(-)	(-)
VK	44,49	80,00	170,59	(170,59)	(-)	(-)	-	(-)	(-)

4.1.1.4 Versuchsgruppe „juvenil“

Abbildung 4.5 zeigt die Tubuli seminiferi contorti der circa 2 bis 2,5 Monate alten Hunde. Bei den juvenilen gewundenen Hodenkanälchen handelte es sich um kompakte Gebilde, welche weder ein Lumen noch ein im Hinblick auf die Spermatogenese aktives Keimepithel aufwiesen. Das intratubuläre Vorkommen von Zellen beschränkte sich auf die lediglich unreifen, einen ovoiden Zellkern tragenden Sertolizellen (SZ) sowie die fetalen kleinen (gz) und großen (GZ) Gonozyten. Während die Nähr- und Stützzellen ein- oder mehrreihig in Nähe der Basalmembran lokalisiert waren, befanden sich die fetalen Keimzellen sowohl in basaler als auch zentraler Position.

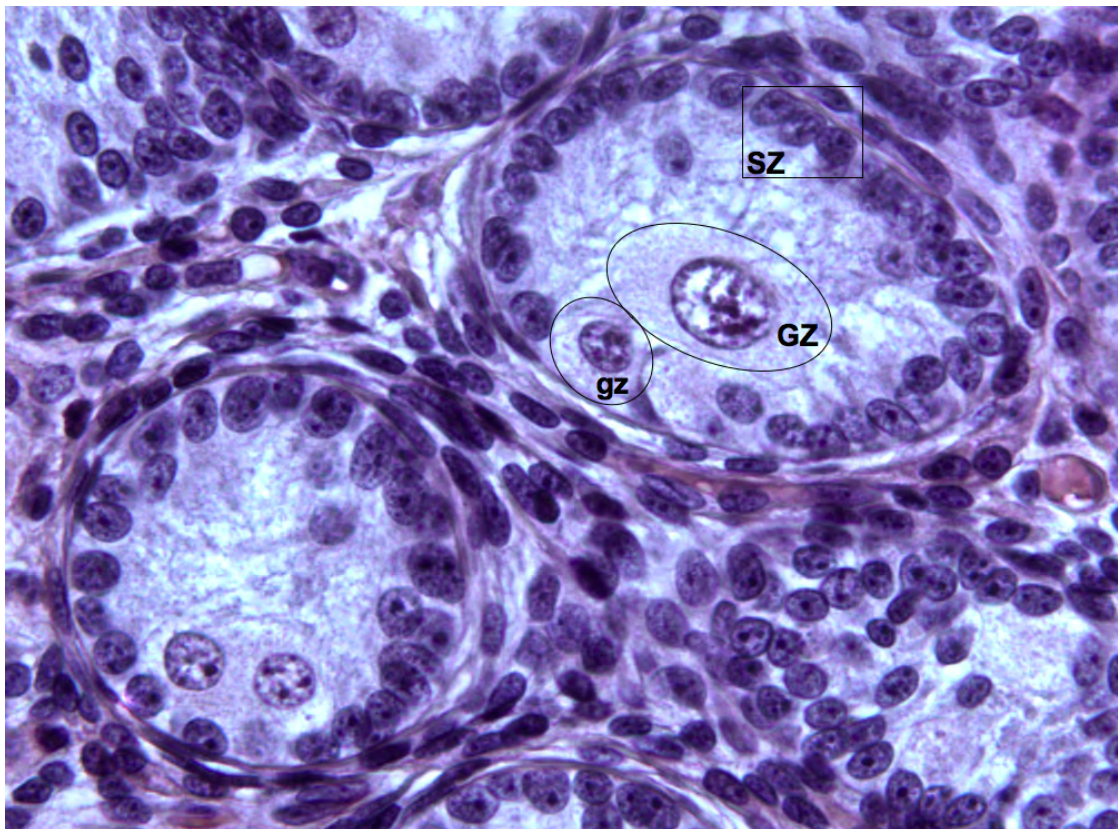


Abbildung 4.5: Tubulus seminiferus contortus der Versuchsgruppe „juvenil“ (400 x)
[SZ (Sertolizelle), GZ (Gonozyt groß), gz (Gonozyt klein)]

Einen Überblick über die Lage und den Typ der Gonozyten gibt Tabelle 4.6. Mit $79,28 \pm 5,63$ % fanden sich intratubulär meist große Gonozyten, welche zudem überwiegend zentral gelegen waren.

Tabelle 4.6: Prozentualer Anteil (%) großer (GZ) und kleiner (gz) Gonozyten und deren Verteilung auf die intratubulären Positionen (zentral, basal) in den Tubuli seminiferi contorti der Versuchsgruppe „juvenil“ [$\bar{x} \pm \text{SD}$; VK (Variationskoeffizient)]

Hund	Gonozyten (%)					
	GZ			gz		
	gesamt	zentral	basal	gesamt	zentral	basal
AverellD	85,31	60,94	24,38	14,69	8,13	6,56
JackD	78,38	61,62	16,76	21,62	10,27	11,35
WilliamD	74,15	57,20	16,95	25,85	22,46	3,39
\bar{x}	79,28	59,92	19,36	20,72	13,62	7,10
SD	5,63	2,83	4,34	5,63	7,73	4,01
VK	7,10	4,72	22,42	27,17	56,75	56,48

4.1.2 Flächeninhalt des Tubulusquerschnittes

Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.7 zusammengefasst.

Tabelle 4.7: Mittlerer Flächeninhalt (μm^2) eines Tubulus seminiferus contortus-Querschnittes [$\bar{x} \pm \text{SD}$; min. - max.]

		Flächeninhalt (μm^2) Tubulusquerschnitt			
		\bar{x}	SD	min.	max.
„Gonazon [®] “	DG A	9881,78 ^a	4734,62	5812,86	16656,94
	DG B	15883,19 ^{a,b}	1705,64	14338,25	17713,53
	DG C	20990,48 ^{b,c}	2970,10	16705,68	25075,29
	DG D	29925,95 ^d	5971,47	24430,64	36700,00
„Kontrolle adult“		27616,55 ^{c,d}	3089,37	25064,52	31153,66
„Profact [®] “		6660,62	2096,35	5320,62	9076,47
„juvenil“		3253,15	303,04	2970,76	3573,31
Data I ¹⁾	ANOVA	$p < 0,0001 \rightarrow$ Tukey-Test: $p \leq 0,05$ (DG C vs. DG D) und $p \leq 0,01$ (übrige Signifikanzen)			
Data II ²⁾	ANOVA	n.s.			

¹⁾ Data I (Datenanalyse I): Versuchsgruppen „Gonazon[®]“ und „Kontrolle adult“

²⁾ Data II (Datenanalyse II): Versuchsgruppen „Gonazon[®]“ (DG A), „Profact[®]“, „juvenil“

ANOVA (einfaktorielle Varianzanalyse)	} Werte mit ungleichen Minuskeln (Data I) bzw. ungleichen Majuskeln (Data II) unterscheiden sich signifikant
Tukey-Test	

4.1.2.1 Versuchsgruppe „Gonazon[®]“

Unter Einbeziehung der „Kontrolle adult“ ergab sich für die Versuchsgruppe „Gonazon[®]“ mit $p < 0,0001$ ein hochsignifikanter Einfluss der Gruppe. Wie aus Tabelle 4.7 und Abbildung 4.6 ersichtlich, unterschieden sich beim paarweisen Gruppenvergleich mittels Tukey-Test die Gruppe DG A von DG C, DG D und „Kontrolle adult“ ($p \leq 0,01$), die Gruppe DGB von DG D und „Kontrolle adult“ ($p \leq 0,01$) sowie die Gruppe DG C von DG D

($p \leq 0,05$). Ein signifikanter Unterschied der Gruppen DG C bzw. DG D von der Gruppe „Kontrolle adult“ lag nicht vor.

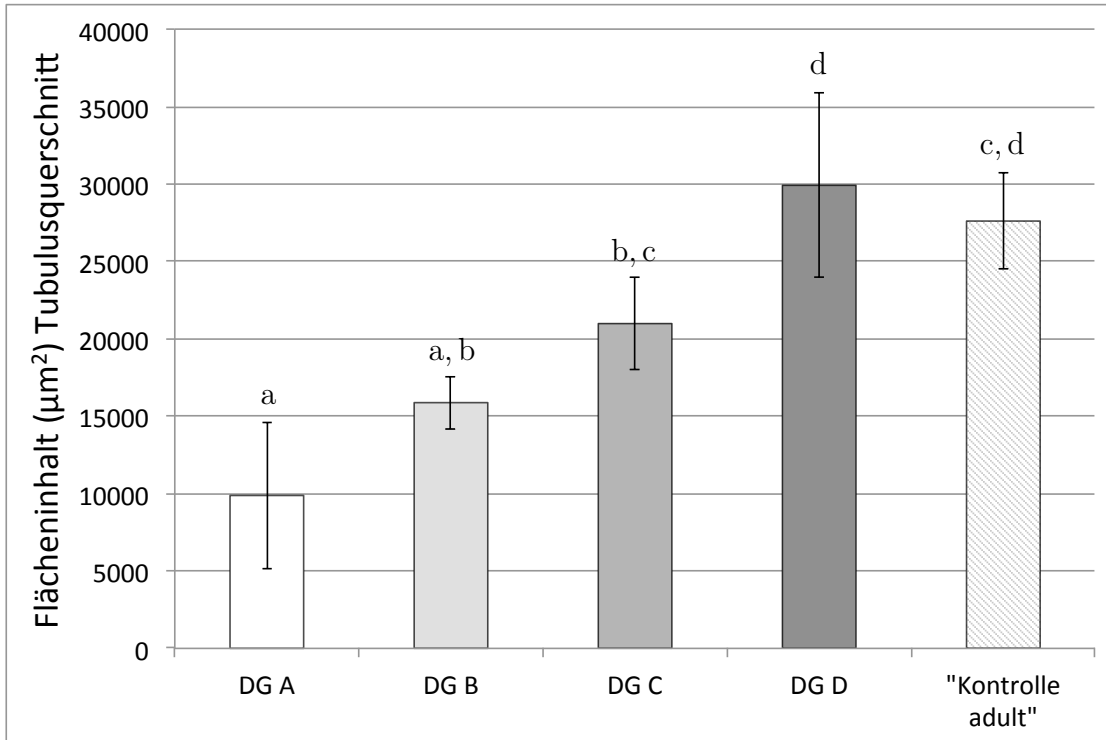


Abbildung 4.6: Mittlerer Flächeninhalt (μm^2) eines Tubulus seminiferus contortus-Querschnittes der Versuchsgruppen „Gonazon®“ und „Kontrolle adult“ [$\bar{x} \pm \text{SD}$; Tukey-Test: $p \leq 0,05$ (DG C vs. DG D) und $p \leq 0,01$ (übrige Signifikanzen); Balken mit ungleichen Minuskeln unterscheiden sich signifikant]

Die Zunahme der tubulären Querschnittsfläche ergab sich aus der fortschreitenden Entwicklung der Tubulustypen; der Zusammenhang war nach dem Rangkorrelationstest nach Spearman hochsignifikant [Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman $r_s = 0,58$; $p < 0,0001$].

4.1.2.2 Versuchsgruppen DG A, „Profact®“ und „juvenil“

In der Versuchsgruppe „Profact®“ lag der mittlere Flächeninhalt eines Tubulusquerschnittes bei $6660,62 \pm 2096,35 \mu\text{m}^2$, in der Versuchsgruppe „juvenil“ bei $3253,15 \pm 303,04 \mu\text{m}^2$ (siehe Tabelle 4.7 und Abbildung 4.7).

Obwohl in der Versuchsgruppe „juvenil“ ein tendenziell kleinerer mittlerer Flächeninhalt der Tubulusquerschnitte sichtbar war, ergab der Vergleich der Gruppen DG A, „Profact®“ und „juvenil“ mit $p = 0,0896$ einen außerhalb des Signifikanzbereiches liegenden Wert.

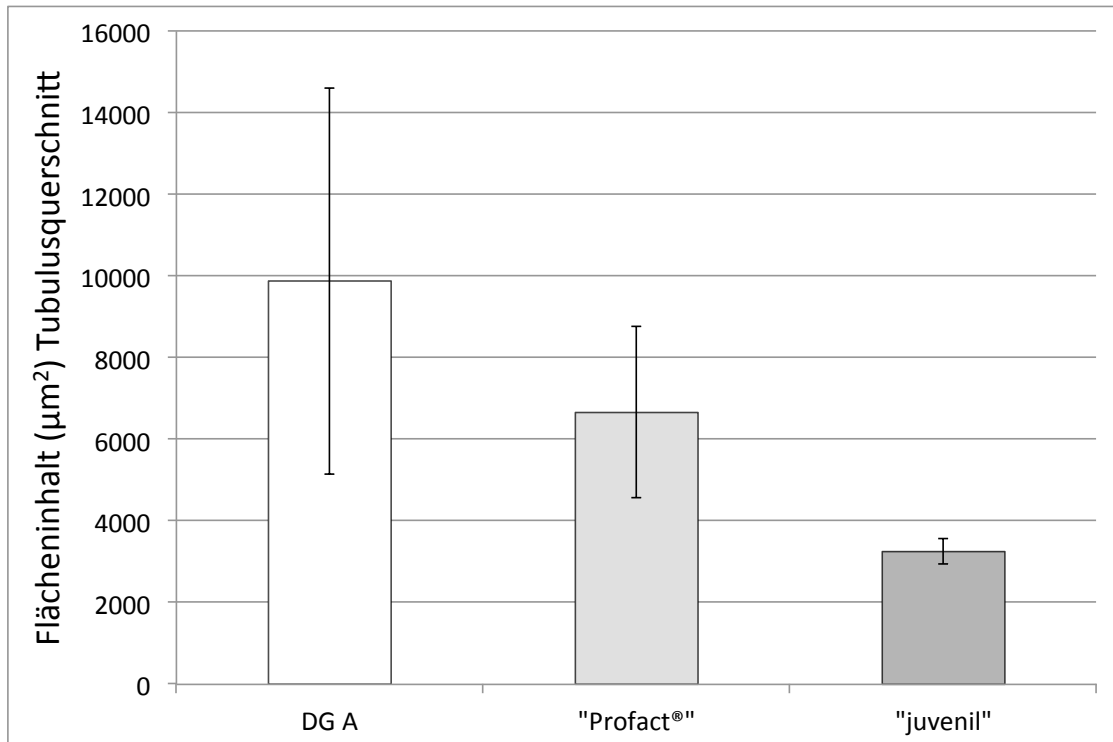


Abbildung 4.7: Mittlerer Flächeninhalt (μm^2) eines Tubulus seminiferus contortus-Querschnittes der Versuchsgruppen „Gonazon®“ (DG A), „Profact®“ und „juvenil“ ($\bar{x} \pm \text{SD}$)

4.2 Androgenrezeptor

4.2.1 Western Blot

Wie bereits in Kapitel 3.5 ausgeführt, sollte mittels Western Blot die Spezifität des in den immunhistochemischen Untersuchungen verwendeten Antikörpers zur Darstellung des Androgenrezeptors (AR) überprüft werden. Abbildung 4.8 zeigt das Untersuchungsergebnis.

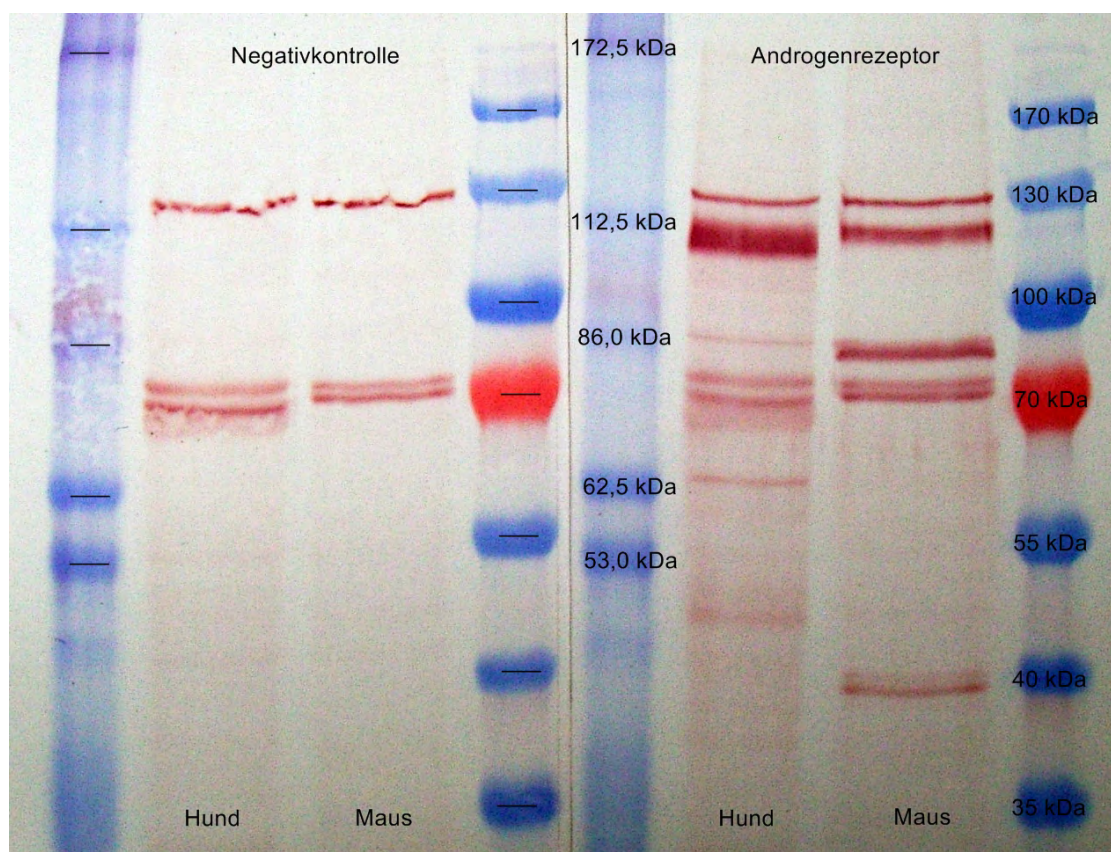


Abbildung 4.8: Western Blot zur Überprüfung der Spezifität des in der Immunhistochemie zur Darstellung des Androgenrezeptors [AR (110 kDa)] verwendeten Antikörpers AR(N-20):sc-816

Das molekulare Gewicht des humanen AR liegt bei 110 kDa (BRINKMANN et al., 1989a; VAN LAAR et al., 1989). Wie aus Abbildung 4.8 ersichtlich, ergab sich in diesem Bereich für die Gesamtprotein-Extrakte von Rüde und Maus eine in Stärke und Farbintensität dominierende Bande, welche in der Negativkontrolle fehlte. Eine weitere sowohl beim Hund als auch insbesondere bei der Maus ausgeprägte Bande auf Höhe von circa 86 kDa fand sich ebenfalls ausschließlich in der mit dem Antikörper inkubierten Probe. Beim Hund

zeigte sich zudem eine weitere Bande im Bereich von 62,5 kDa sowie circa 50,0 kDa, bei der Maus im Bereich von circa 40 kDa.

Die sowohl beim Hund als auch bei der Maus erkennbaren Banden bei circa 70 kDa und 130 kDa können aufgrund ihres gleichzeitigen Vorhandenseins in der Negativkontrolle als unspezifisch bezeichnet werden.

4.2.2 Immunhistochemische Untersuchung

4.2.2.1 Identifizierung Androgenrezeptor (AR)-positiver tubulärer Zellen

Um eine sichere Differenzierung zwischen Spermatogonien und Sertolizellen zu erreichen, erfolgte die zeitgleiche Darstellung des die Sertolizelle charakterisierenden mesenchymalen Zytoskelettproteins Vimentin und des AR mittels immunhistochemischer Doppelfärbung (siehe Abbildung 4.9).

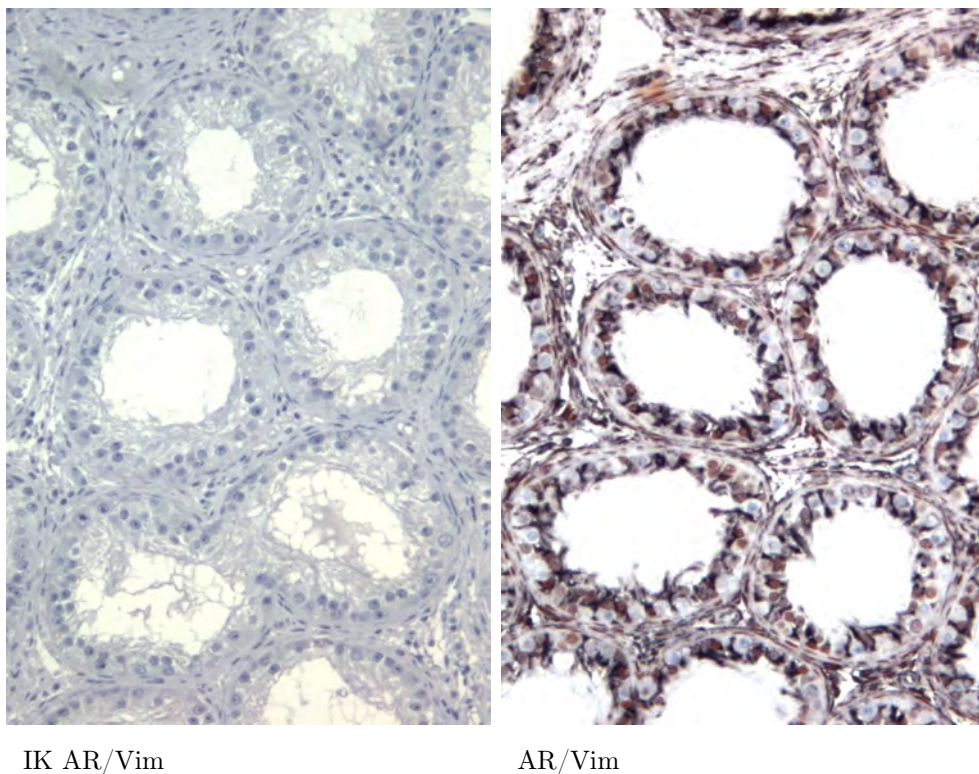
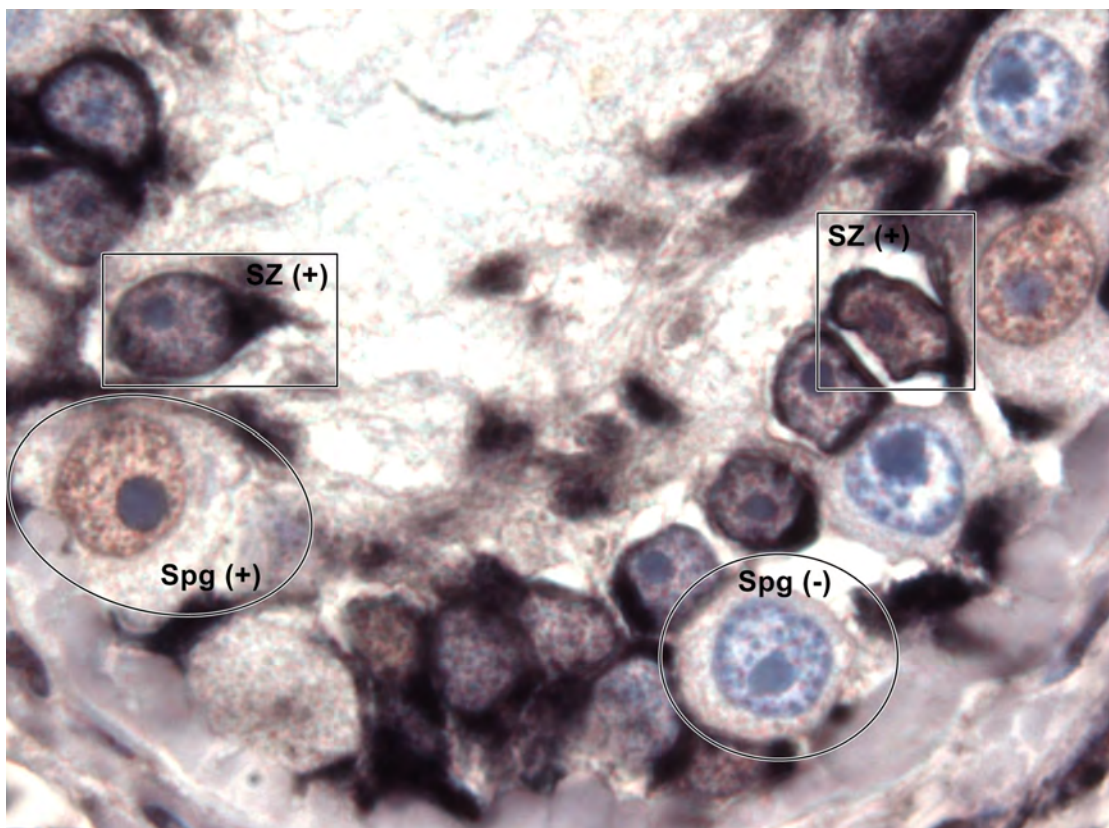


Abbildung 4.9: Isotypenkontrolle (IK) und immunhistochemischen Doppelfärbung Androgenrezeptor/Vimentin (AR/Vim) im caninen Hodengewebe (100 x)

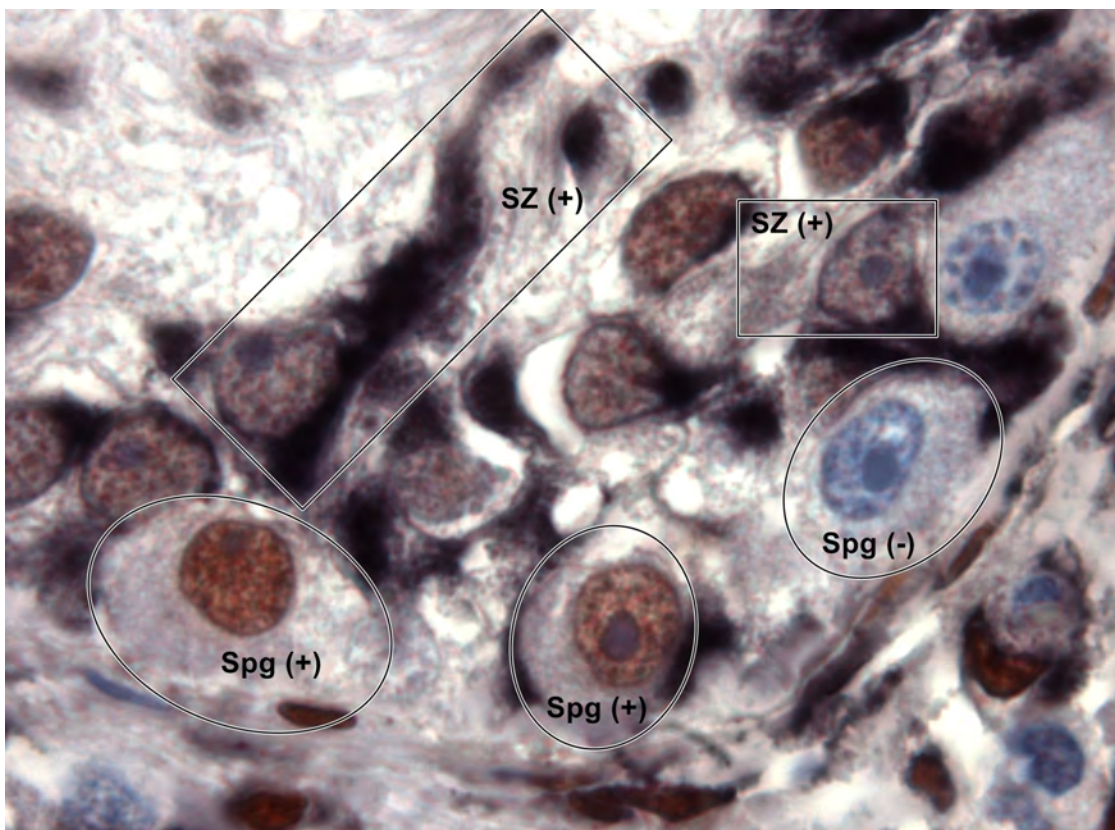
Die Untersuchung wurde exemplarisch an Tieren der Versuchsgruppen „Gonazon®“ Gruppe DG A, „Profact®“ und „juvenil“ durchgeführt; die jeweiligen Isotypenkontrollen wiesen keine unspezifische Färbung auf.

Wie aus der Abbildung 4.10 (Seite 140f.) hervorgeht, ließen sich bei den Versuchsgruppen „Gonazon®“ DG A und „Profact®“, nicht aber bei der Versuchsgruppe „juvenil“, AR-positive Sertolizellen nachweisen. Auch einige Spermatogonien der Versuchsgruppen „Gonazon®“ Gruppe DG A und „Profact®“ zeigte eine eindeutige nukleäre Färbung, wohingegen die Gonozyten der Versuchsgruppe „juvenil“ ungefärbt blieben.

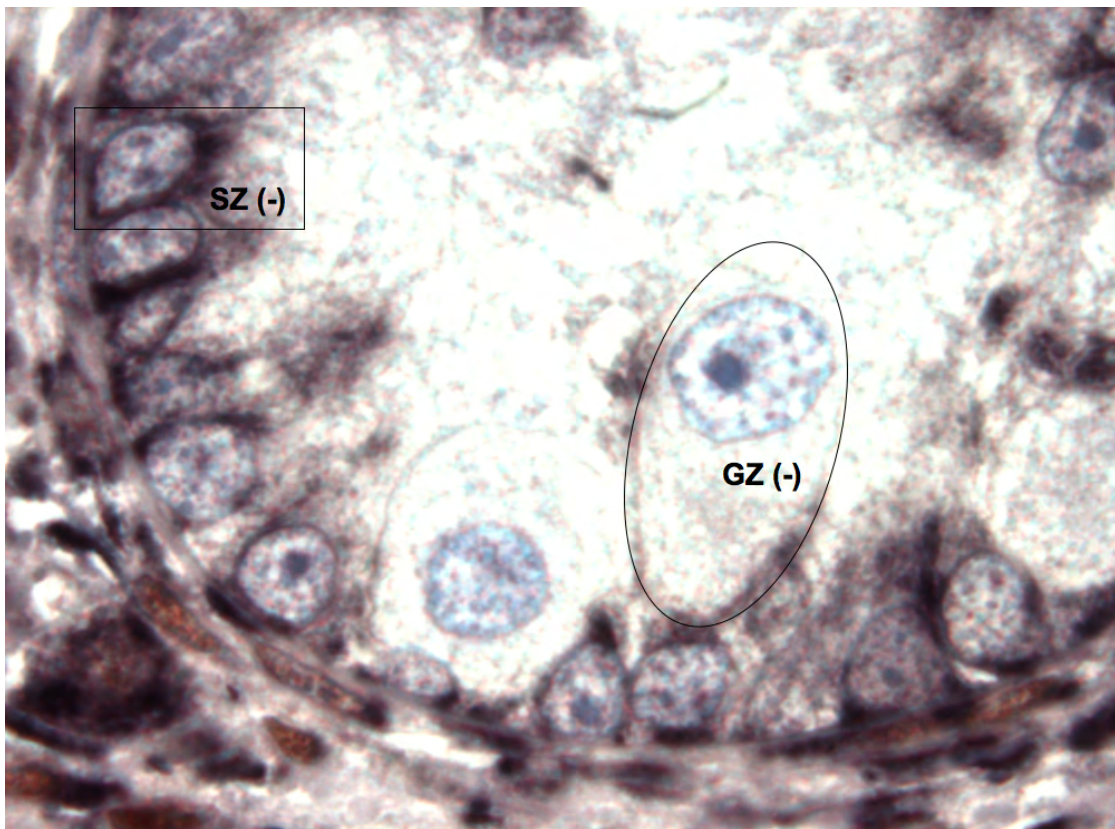


„Gonazon®“ DG A

Abbildung 4.10: Immunhistochemische Doppelfärbung Androgenrezeptor_(rotbraun)/Vimentin_(schwarz) (AR/Vim) der Versuchsgruppe „Gonazon®“ (DG A), „Profact®“ und „juvenil“ (1000 x) [SZ (Sertolizelle), Spg (Spermatogonie), GZ (Gonozyt groß, (-)/(+) (negatives/positives immunhistochemisches Färbeverhalten)]



„Profact®“



„juvenil“

Abbildung 4.10: Fortsetzung (Abbildungsbeschriftung siehe Abbildung 4.10, Seite 140)

4.2.2.2 Quantitativer Nachweis der Expression des Androgenrezeptors (AR) im Gesamthoden

4.2.2.2.1 Definition der erfassten AR-positiven Zellen Wie bereits in Kapitel 4.2.2.1 ausgeführt, gelang ein positiver Nachweis des AR in den Sertolizellen und Spermatogonien, sowie den Leydigzellen und peritubulären Zellen (siehe Abbildung 4.11). Im Hinblick auf die funktionelle Bedeutung wurden bei den weiteren Auswertungen jedoch lediglich die Sertolizellen (SZ), Spermatogonien (Spg) und Leydigzellen (LZ) berücksichtigt.

Die zur Verifizierung der Beobachtungen durchgeführten Isotypenkontrollen verliefen stets negativ (siehe Abbildung 4.9).

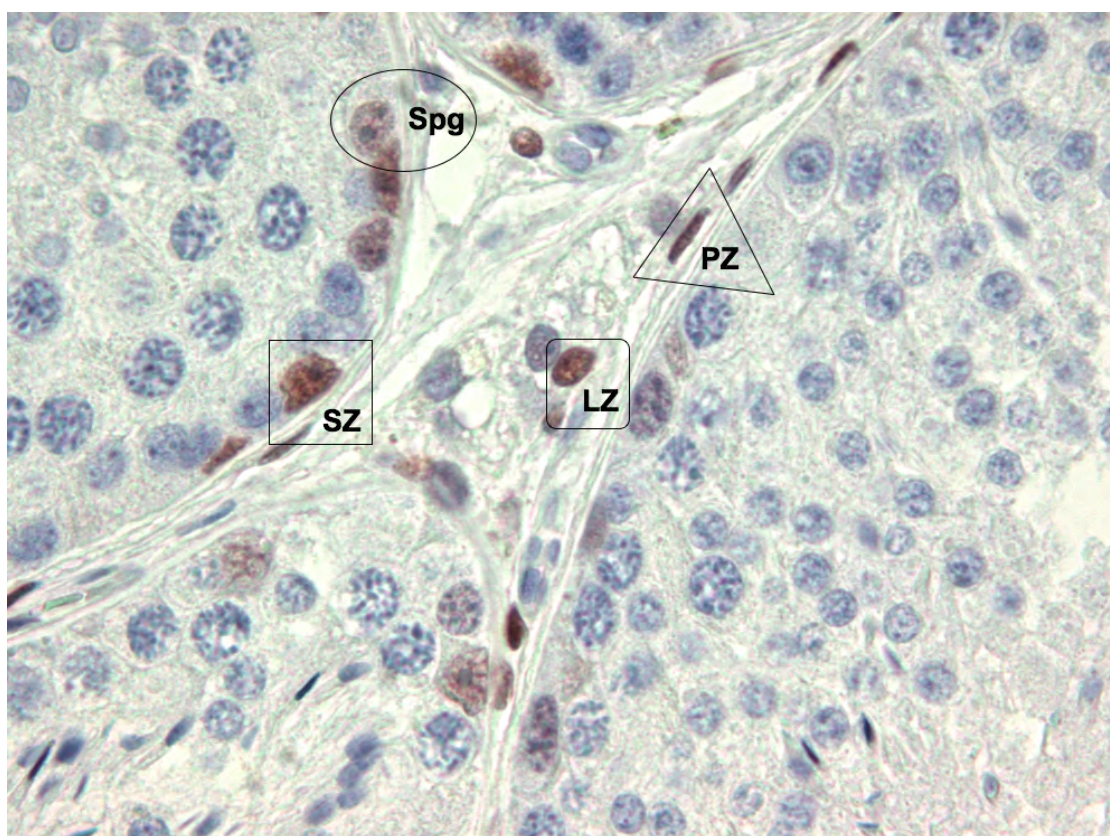


Abbildung 4.11: Immunhistochemische Färbung des Androgenrezeptors (AR) (400 x) [SZ (Sertolizelle), Spg (Spermatogonie), LZ (Leydigzelle), PZ (peritubuläre Zelle)]

4.2.2.2.2 Expression des AR in den Sertolizellen (SZ) Die Ergebnisse der im Mittel pro Tubulus seminiferus contortus beobachteten Anzahl sämtlicher, AR-positiver als auch intratubulär basal lokalisierter AR-positiver Sertolizellen sind in Tabelle 4.8 dargestellt.

Tabelle 4.8: Gesamtzahl (Σ) und Anzahl Androgenrezeptor-positiver (AR-pos.) sowie AR-pos. basalständiger (AR-pos. bas.) Sertolizellen (SZ) pro Tubulus seminiferus contortus-Querschnitt [$\bar{x} \pm$ SD; min. - max.]

SZ / Tubulusquerschnitt													
Σ					AR-pos.				AR-pos. bas.				
					\bar{x}	SD	min.	max.	\bar{x}	SD	min.	max.	
DGA	16,2 ^{A,B}	5,5	9,1	22,3	10,0	10,3	0,0	22,1	4,9	5,6	0,0	10,4	
	14,3	2,6	11,8	17,0	14,2	2,6	11,7	16,8	9,7	3,6	6,4	13,6	
	14,5	2,9	10,7	19,4	14,3	2,8	10,6	19,0	11,5	3,3	7,1	16,2	
	15,6	2,7	11,4	17,7	15,5	2,7	11,4	17,7	14,1	2,5	10,3	16,8	
„Kontrolle adult“	15,5	1,3	14,1	17,0	15,5	1,3	14,0	17,0	14,4	1,5	12,2	16,1	
„Profact®“	12,5 ^A	6,7	5,4	18,7	5,9	10,1	0,0	17,6	1,2	2,0	0,0	3,5	
„juvenil“	25,1 ^B	1,8	23,0	26,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Data I ¹⁾	ANOVA	n. s.			-					-			
	KWT	-			n. s.					$p=0,0212 \rightarrow$ Dunn-Test: n. s.			
Data II ²⁾	ANOVA	$p=0,0493 \rightarrow$ Tukey-Test: $p \leq 0,05$			-					-			
	ext KWT	-			n. s.					n. s.			

¹⁾ Data I (Datenanalyse I): Versuchsgruppen „Gonazon®“ und „Kontrolle adult“

²⁾ Data II (Datenanalyse II): Versuchsgruppen „Gonazon®“ (DGA), „Profact®“, „juvenil“

ANOVA (einfaktorielle Varianzanalyse)
KWT (Kruskal-Wallis-Test)
ext KWT (exakter Kruskal-Wallis-Test)
Tukey-Test
Dunn-Test

signifikant (p -Wert) / nicht signifikant (n.s.);
Werte mit ungleichen Minuskeln (Data I) bzw. ungleichen Majuskeln (Data II) unterscheiden sich signifikant

4.2.2.2.1 Versuchsgruppe „Gonazon®“ Die mittlere Gesamtzahl der SZ pro Tubulusquerschnitt lag zwischen $14,3 \pm 2,6$ und $16,2 \pm 5,5$; ein Effekt der Gruppe zeigte sich unter Einbeziehung der Versuchsgruppe „Kontrolle adult“ nicht (siehe Abbildung 4.12).

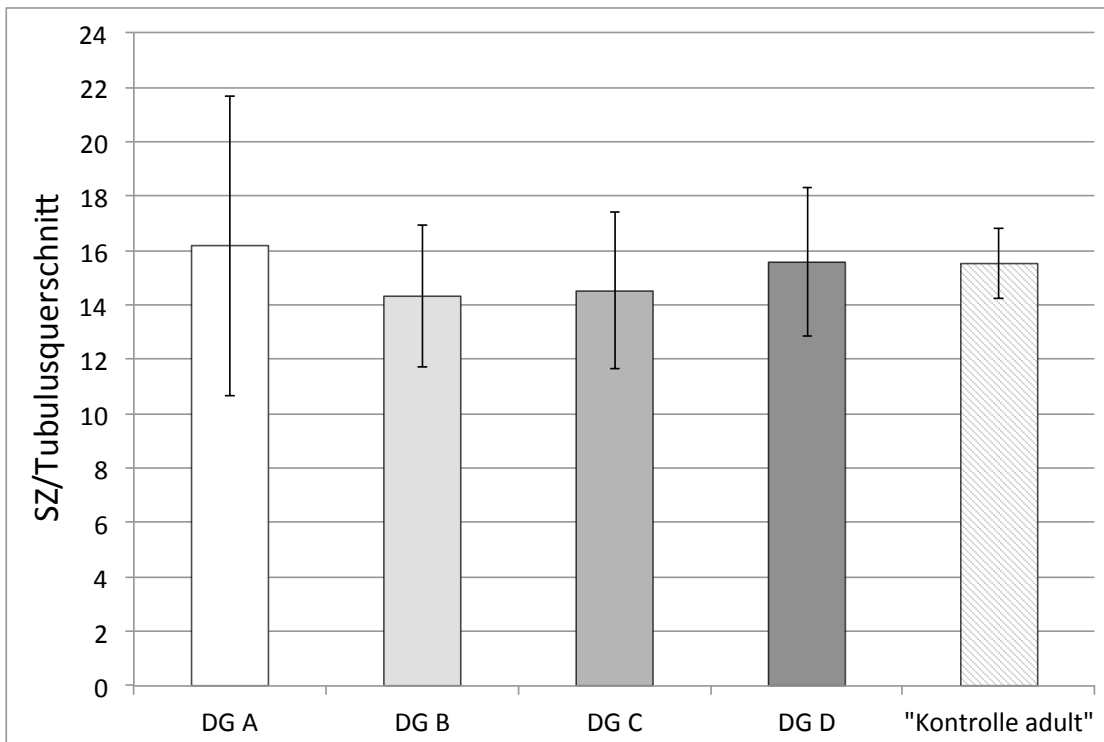


Abbildung 4.12: Gesamtzahl Sertolizellen (SZ) pro Tubulus seminiferus contortus-Querschnitt der Versuchsgruppen „Gonazon®“ und „Kontrolle adult“ [$\bar{x} \pm SD$]

Während bei der Gruppe DG A lediglich circa 60 % der erfassten SZ AR-positiv waren, wiesen bei den Gruppen DG B, DG C und DG D sowie der „Kontrolle adult“ annähernd 100 % der SZ eine positive Färbung auf. Auch hier war unter Einbeziehung der „Kontrolle adult“ ein Effekt der Gruppe nicht nachweisbar.

Circa 50 % der AR-positiven SZ der Gruppe DG A befanden sich in basalständiger Position. Dieser Anteil nahm im Verlauf der Rekrudescenz kontinuierlich zu und betrug in der Gruppe DG D annähernd 95 %. Unter Einbeziehung der „Kontrolle adult“ ergab sich für die Anzahl AR-positiver basalständiger SZ mit $p = 0,0212$ (Kruskal-Wallis-Test) ein signifikanter Einfluss der Gruppe. Wie aus Tabelle 4.8 und Abbildung 4.13 ersichtlich,

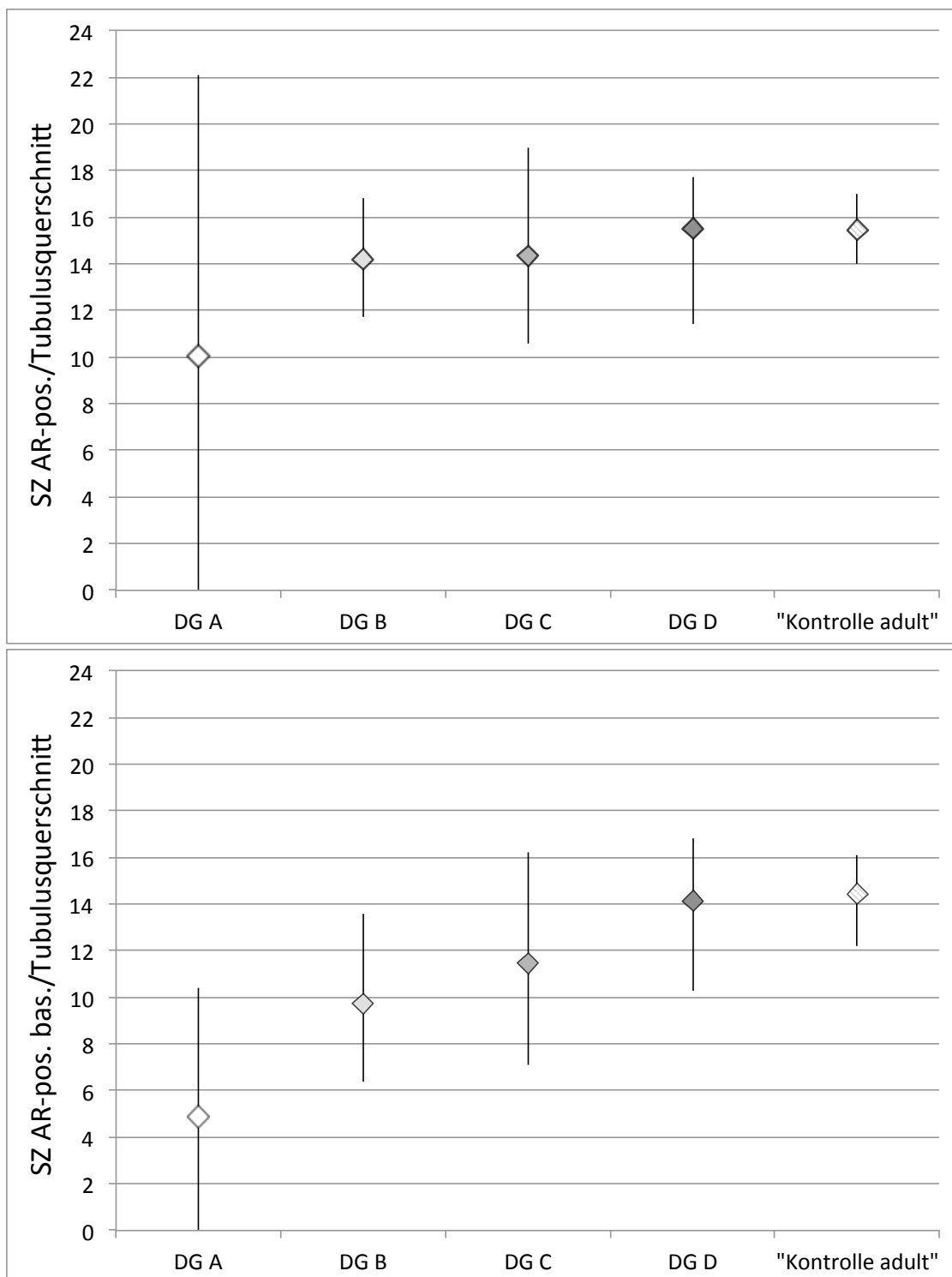


Abbildung 4.13: Anzahl Androgenrezeptor-positiver (AR-pos.) sowie basalständiger AR-pos. (AR-pos. bas.) Sertolizellen (SZ) pro Tubulus seminiferus contortus-Querschnitt der Versuchsgruppen „Gonazon[®]“ und „Kontrolle adult“ [\bar{x} ; min. - max.]

verlief der sich anschließende paarweise Gruppenvergleich (Dunn-Test) jedoch negativ; lediglich beim Vergleich der Gruppe DG A mit der „Kontrolle adult“ ergab sich mit $p = 0,052$ ein Wert knapp oberhalb des Signifikanzbereiches.

4.2.2.2.2 Versuchsgruppen DG A, „Profact®“ und „juvenil“ Für die Gesamtzahl der SZ pro Tubulusquerschnitt ergab sich mit $p = 0,0493$ ein signifikanter Effekt der Gruppe (ANOVA). Dabei war mit $p \leq 0,05$ der Wert der Gruppe „Profact®“ ($12,5 \pm 6,7$) niedriger als der der Versuchsgruppe „juvenil“ ($25,1 \pm 1,8$). Die Gruppe „Profact®“ unterschied sich nicht von der Gruppe DG A und die Gruppe DG A nicht von der Gruppe „juvenil“ (siehe Tabelle 4.8 und Abbildung 4.14).

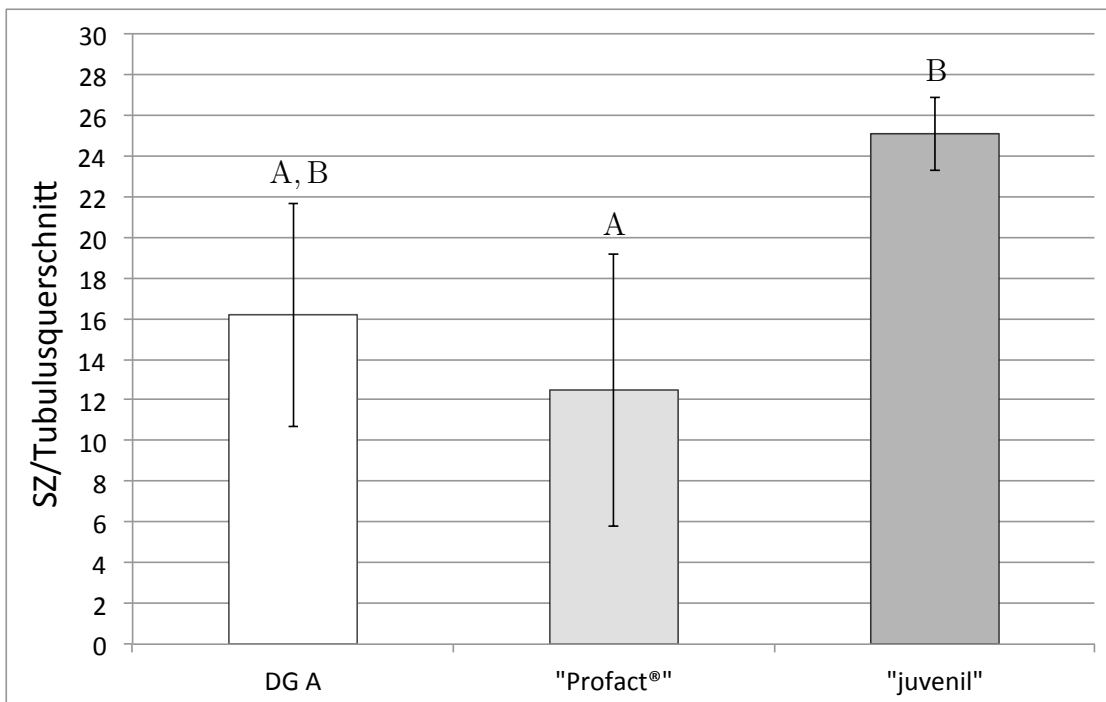


Abbildung 4.14: Gesamtzahl Sertolizellen (SZ) pro Tubulus seminiferus contortus-Querschnitt der Versuchsgruppen „Gonazon®“ (DG A), „Profact®“ und „juvenil“ [$\bar{x} \pm SD$; Tukey-Test_(Σ): $p \leq 0,05$; Balken mit ungleichen Majuskeln unterscheiden sich signifikant]

Eine Expression des AR zeigte sich bei drei von vier Hunden der Gruppe DG A, jedoch nur bei einem der drei Rüden der Gruppe „Profact®“. Dieser Rüde wies pro Tubulusquerschnitt durchschnittlich $17,6 \pm 6,8$ AR-positive Sertolizellen von überwiegend schwacher Färbeintensität (FI(1)) auf. In der Versuchsgruppe „juvenil“ (siehe Abbildung 4.15) war

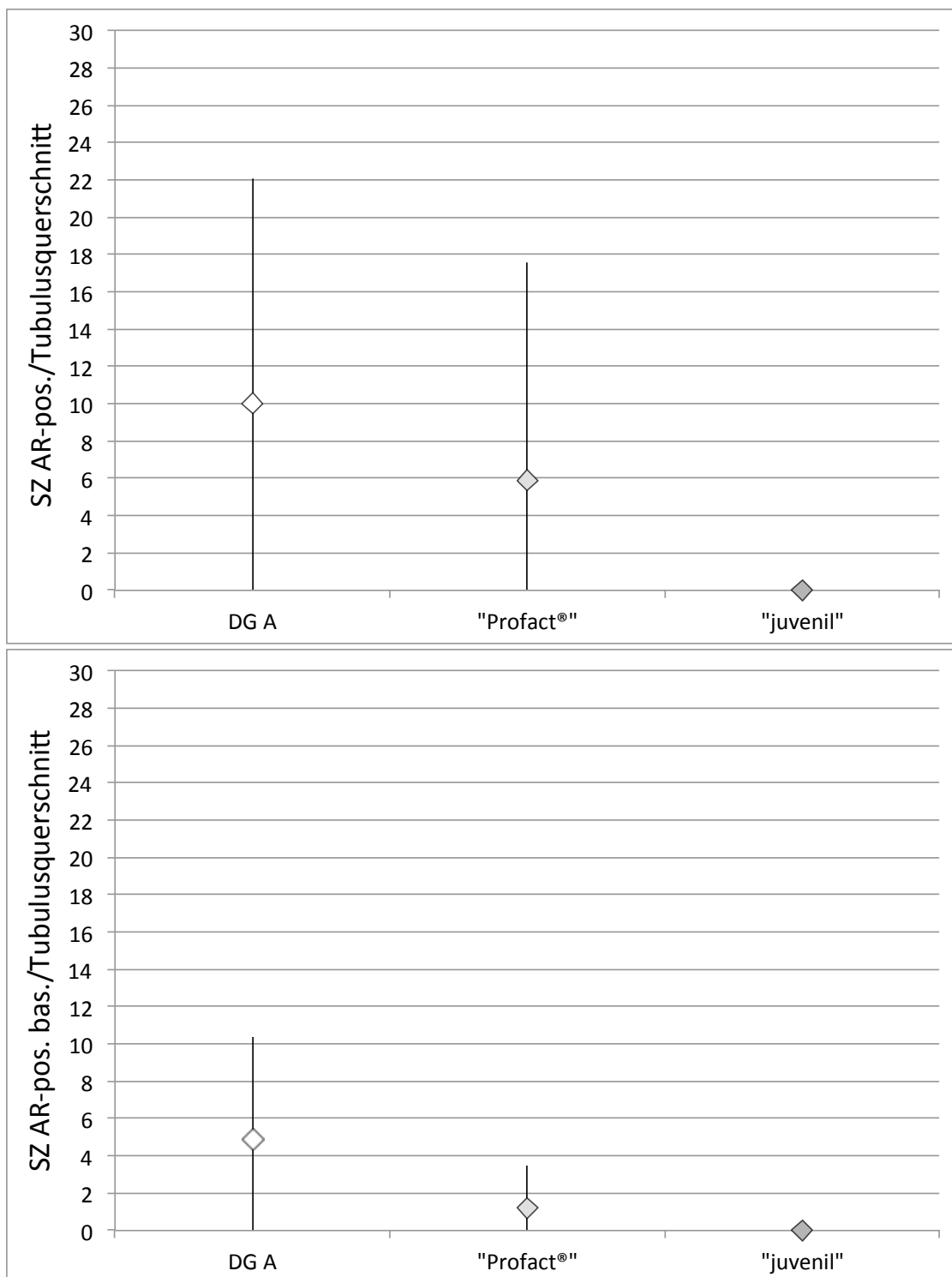


Abbildung 4.15: Anzahl Androgenrezeptor-positiver (AR-pos.) sowie AR-pos. basalständiger (AR-pos. bas.) Sertolizellen (SZ) pro Tubulus seminiferus contortus-Querschnitt der Versuchsgruppen „Gonazon®“ (DG A), „Profact®“ und „juvenil“ [\bar{x} ; min. - max.]

eine immunhistochemische Färbung des AR in den Sertolizellen nicht detektierbar. Ein Unterschied in der Anzahl AR-positiver SZ sowie AR-positiver SZ in basaler Position ergab sich im Vergleich der Versuchsgruppen DG A und „Profact®“ und „juvenil“ nicht (siehe Abbildung 4.15).

4.2.2.2.3 Expression des AR in den Spermatogonien Die Ergebnisse der Expression des AR in den Spermatogonien sind in Tabelle 4.9 zusammengefasst.

Tabelle 4.9: Gesamtzahl (Σ) und Anzahl Androgenrezeptor-positiver (AR-pos.) Spermatogonien (Spg) pro Tubulus seminiferus contortus-Querschnitt [$\bar{x} \pm \text{SD}$; min. - max.]

		Spg / Tubulusquerschnitt							
		Σ				AR-pos.			
		\bar{x}	SD	min.	max.	\bar{x}	SD	min.	max.
„Gonazon®“	DG A	8,4	5,0	3,1	14,5	2,0	1,7	0,0	3,6
	DG B	12,4	4,5	7,4	16,1	2,5	1,3	1,2	3,7
	DG C	14,7	3,4	11,5	20,7	2,1	1,0	1,1	3,5
	DG D	11,5	3,3	7,9	15,2	1,7	0,8	0,9	2,7
„Kontrolle adult“		12,1	3,0	7,7	15,9	1,3	0,7	0,5	2,3
„Profact®“		4,1	0,4	3,6	4,3	0,3	0,4	0,0	0,8
„juvenil“		-	-	-	-	-	-	-	-
DatA I ¹⁾	ANOVA	n. s.				-			
	KWT	-				n.s.			
DatA II ²⁾	t-Test	n.s.				-			
	ext WMWT	-				n.s.			

¹⁾ DatA I (Datenanalyse I): Versuchsgruppen „Gonazon®“ und „Kontrolle adult“

²⁾ DatA II (Datenanalyse II): Versuchsgruppen „Gonazon®“ (DG A), „Profact®“, „juvenil“

ANOVA (einfaktorielle Varianzanalyse)	} signifikant (p -Wert) / nicht signifikant (n.s.); Werte mit ungleichen Minuskeln (DatA I) bzw. ungleichen Majuskeln (DatA II) unterscheiden sich signifikant
KWT (Kruskal-Wallis-Test)	
t-Test	
ext WMWT (exakter Wilcoxon-Mann-Whitney-Test)	

4.2.2.2.3.1 Versuchsgruppe „Gonazon®“ Die Gesamtzahl an Spermatogonien pro Tubulus-Querschnitt variierte zwischen $8,40 \pm 5,0$ und $14,7 \pm 3,4$.

Der Anteil AR-positiver Spermatogonien lag zwischen ca. 14,3 % und 23,8 % und zeigte einen tendenziellen Abfall von Gruppe DG A nach DG D (siehe Tabelle 4.9 und Abbildung 4.16). Ein Einfluss der Gruppe war unter Einbeziehung der Versuchsgruppe „Kontrolle adult“ allerdings weder im Hinblick auf die Gesamtzahl noch auf die Anzahl der den AR exprimierenden Spermatogonien nachweisbar.

4.2.2.2.3.2 Versuchsgruppen DG A, „Profact®“ und „juvenil“ Im Vergleich zur Versuchsgruppe „Gonazon®“ Gruppe DG A ergab sich für die Gruppe „Profact®“ eine deutlich geringere Anzahl an Spermatogonien pro Tubulus seminiferus contortus-Querschnitt ($8,4 \pm 5,0$ versus $4,1 \pm 0,4$); ein signifikanter Unterschied zeigte sich jedoch nicht (siehe Tabelle 4.9 und Abbildung 4.17).

Die zelluläre Detektion des AR gelang bei zwei der drei Rüden der Gruppe „Profact®“. Im Mittel lagen bei dieser Gruppe pro Tubulusquerschnitt 0,3 (0,0 - 0,8) AR-positive Spermatogonien von lediglich schwacher Färbeintensität FI (1) vor; ein signifikanter Unterschied zu der Gruppe DG A (2,0; 0,0 - 3,6) zeigte sich jedoch nicht.

Bei der Versuchsgruppe „juvenil“ waren als germinative Zellen in den Tubuli seminiferi contorti ausschließlich AR-negative große und kleine Gonozyten nachweisbar.

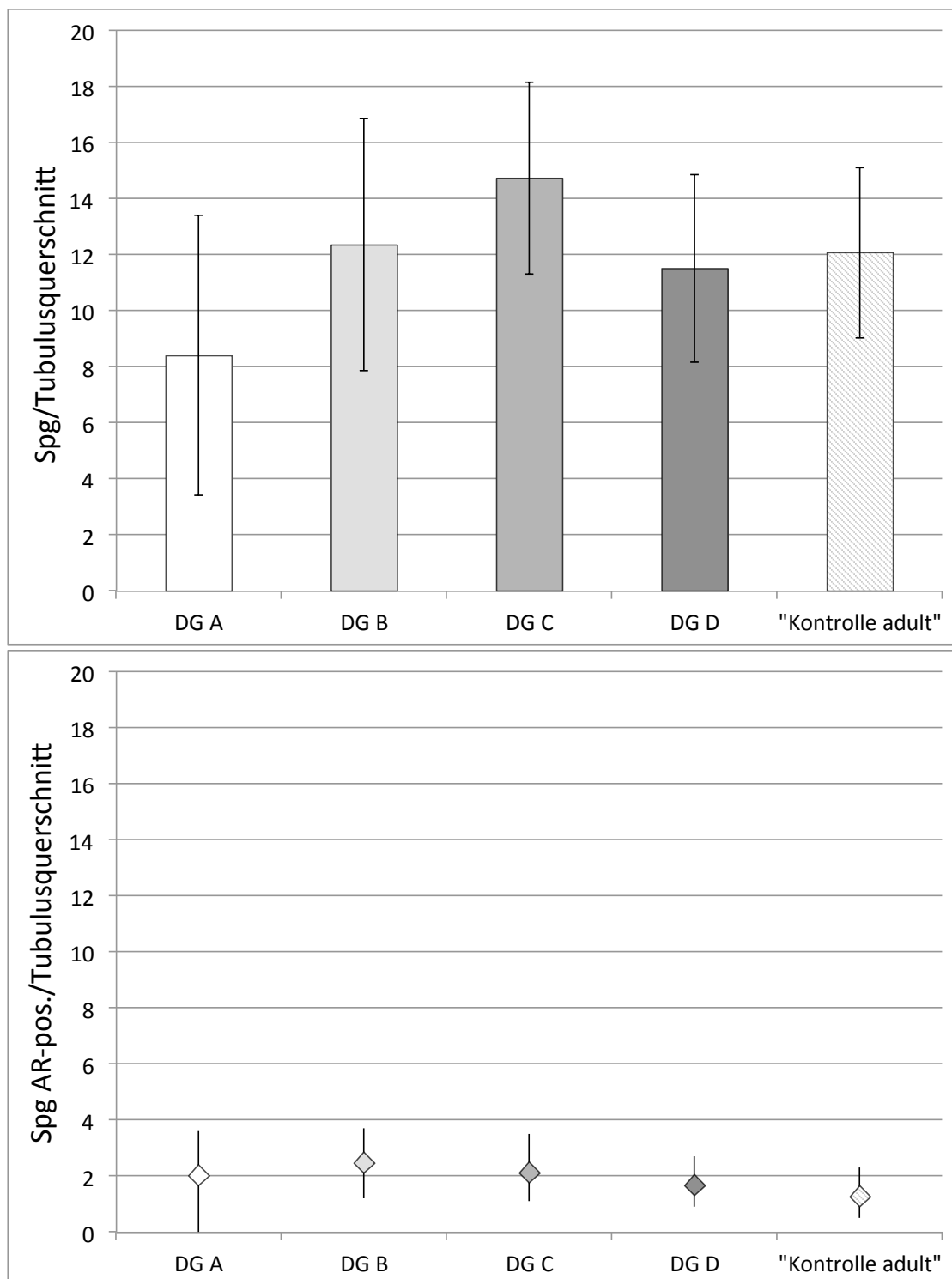


Abbildung 4.16: Gesamtzahl [$\bar{x} \pm \text{SD}$] und Anzahl Androgenrezeptor-positiver (AR-pos.) [\bar{x} ; min. - max.] Spermatogonien (Spg) pro Tubulus seminiferus contortus-Querschnitt der Versuchsgruppen „Gonazon®“ und „Kontrolle adult“

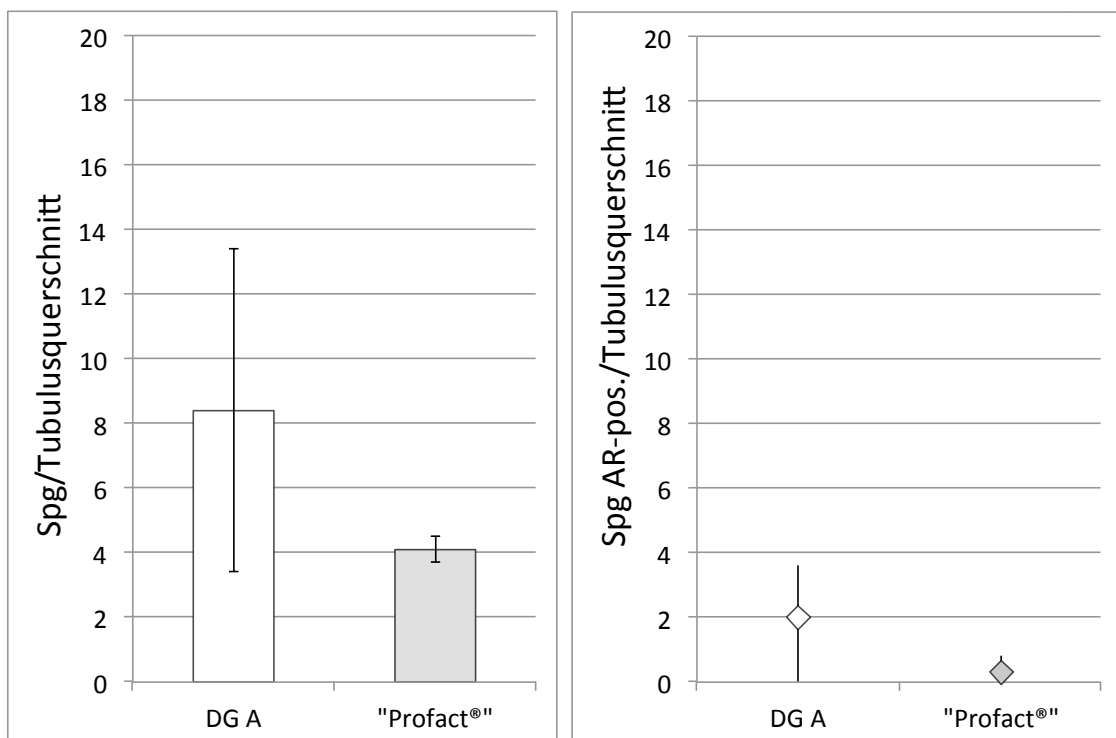


Abbildung 4.17: Gesamtzahl [$\bar{x} \pm SD$] und Anzahl Androgenrezeptor-positiver (AR-pos.) [\bar{x} ; min. - max.] Spermatogonien (Spg) pro Tubulus seminiferus contortus-Querschnitt der Versuchsgruppen „Gonazon®“ (DG A) und „Profact®“

4.2.2.2.4 Expression des AR in den Leydigzellen Die Ergebnisse zur Expression des AR in den Leydigzellen sind in Tabelle 4.10 zusammengefasst.

4.2.2.2.4.1 Versuchsgruppe „Gonazon®“ Der mittlere Anteil AR-exprimierender Leydigzellen lag zwischen 42,8 % und 86,6 % [siehe Tabelle 4.10 sowie Abbildung 4.18 (Seite 153 ff.)] und wies insbesondere in der Gruppe DG A eine hohe Variabilität auf. Ein Einfluss der Gruppe zeigte sich unter Einbeziehung der Versuchsgruppe „Kontrolle adult“ nicht.

Tabelle 4.10: Prozentualer Anteil (%) Androgenrezeptor-positiver Leydigzellen (AR-pos. LZ) und deren Verteilung auf die Färbeintensitäten (FI) (1), FI 1 und FI 2 [$\bar{x} \pm SD$; min. - max.]

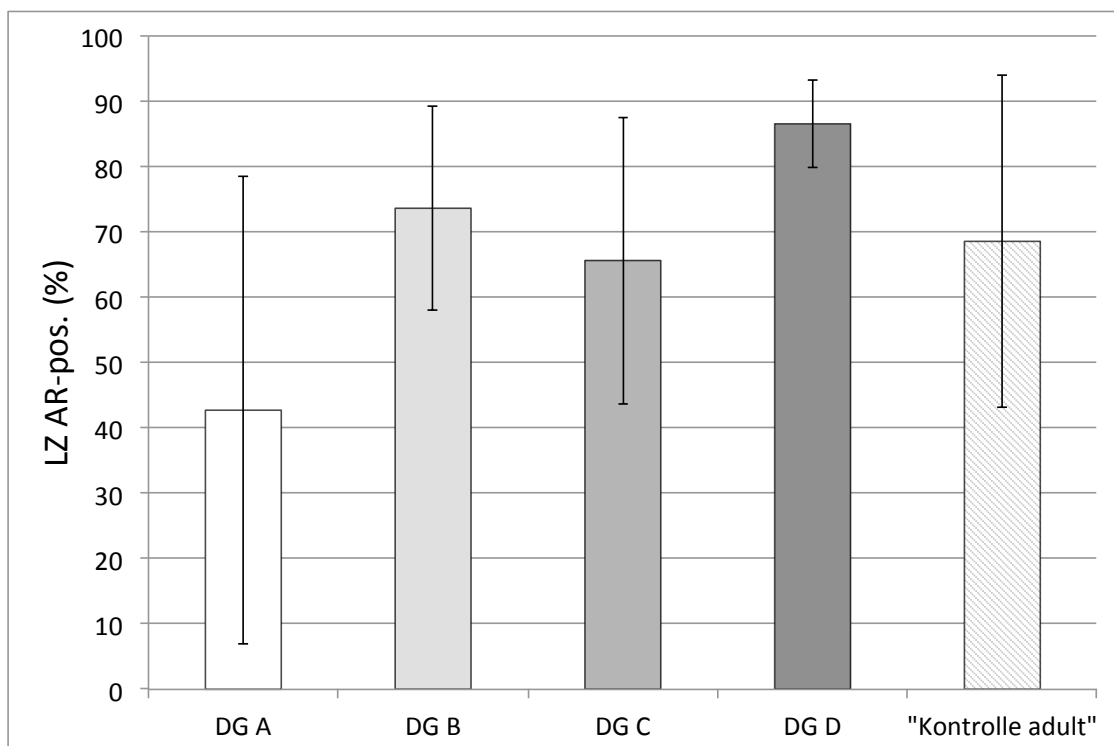
		AR-pos. LZ (%)											
		Σ						FI					
		(1)						1					
		\bar{x}	SD	min.	max.	\bar{x}	SD	min.	max.	\bar{x}	SD	min.	max.
„Gonazon®“	DG A	42,8	35,8	11,0	79,0	19,5 ^a	11,4	10,0	35,0	10,3	11,3	0,0	21,0
	DG B	73,7	15,6	57,0	88,0	33,0 ^{a,b}	9,5	27,0	44,0	23,3	12,9	9,0	34,0
	DG C	65,7	22,0	39,0	89,0	44,0 ^{a,b}	10,9	25,0	53,0	12,8	12,5	2,0	30,0
	DG D	86,6	6,7	75,0	92,0	51,6 ^b	19,3	25,0	74,0	24,4	10,8	11,0	40,0
„Kontrolle adult“		68,6	25,4	38,0	97,0	36,4 ^{a,b}	17,2	21,0	59,0	21,0	10,9	13,0	39,0
„Profact®“		23,7	34,1	4,0	63,0	14,3	17,9	4,0	35,0	5,0	8,7	0,0	15,0
„juvenil“		59,3	8,5	53,0	69,0	37,0	13,1	28,0	52,0	19,0	15,5	4,0	35,0
DatA I ¹⁾	ANOVA	n. s.	$p=0,0442 \rightarrow \text{Tukey-Test}; p \leq 0,05$										
	KWT	-	-										
DatA II ²⁾		n. s.	n. s.										

1) DatA I (Datenanalyse I): Versuchsgruppen „Gonazon®“ und „Kontrolle adult“

2) DatA II (Datenanalyse II): Versuchsgruppen „Gonazon®“ (DG A), „Profact®“, „juvenil“

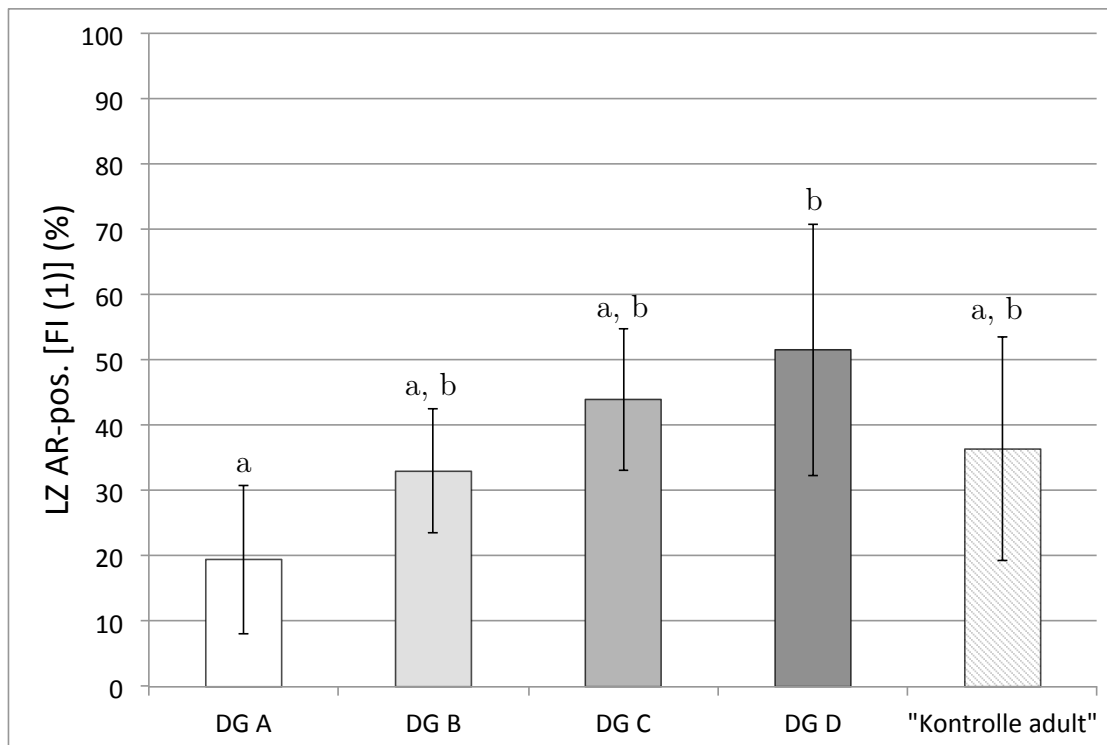
ANOVA (einfaktorielle Varianzanalyse) } signifikant (p -Wert) / nicht signifikant (n.s.);
KWT (Kruskal-Wallis-Test) } Werte mit ungleichen Minuskeln (DatA I) bzw. ungleichen Majuskeln (DatA II) unterscheiden sich
ext KWT (exakter Kruskal-Wallis-Test) } signifikant
Tukey-Test

Während mit circa 45 % bis 67 % ein Großteil der AR-positiven Leydigzellen eine schwache immunhistochemische Färbung [FI (1)] aufwies, verteilte sich der verbleibende Anteil annähernd gleichmäßig auf Zellen der Färbeintensität FI 1 und FI 2. Ein Einfluss der Gruppe zeigte sich nur für FI (1), wobei die Anzahl der die FI (1) aufweisenden LZ in der Gruppe DG A mit $p \leq 0,05$ signifikant niedriger lag als in der Gruppe DG D (siehe Abbildung 4.18, Seite 153 ff.).

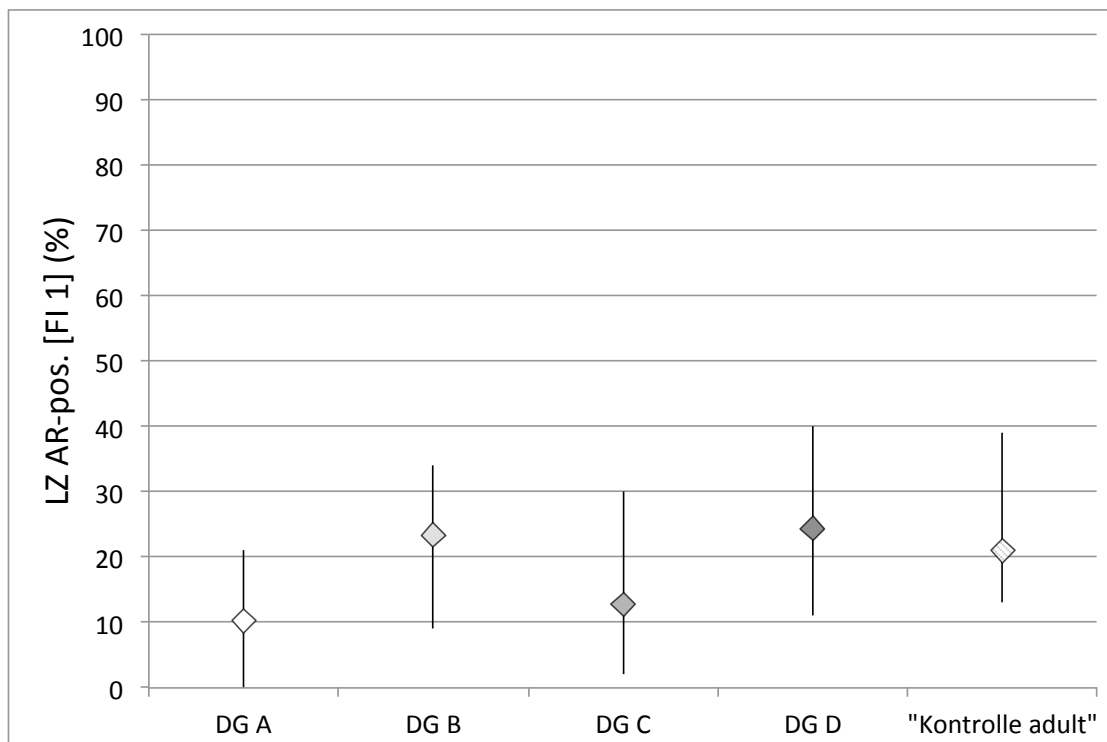


LZ AR-pos.

Abbildung 4.18: Prozentualer Anteil (%) der Androgenrezeptor-positiven Leydigzellen (AR-pos. LZ) und der AR-pos. LZ in Färbeintensität FI(1) [$\bar{x} \pm \text{SD}$; Tukey-Test $_{(\text{FI}(1))}$: $p \leq 0,05$; Balken mit ungleichen Minuskeln unterscheiden sich signifikant] sowie der AR-pos. LZ in Färbeintensität FI 1 und FI 2 [\bar{x} ; min. - max.] der Versuchsgruppen „Gonazon®“ und „Kontrolle adult“

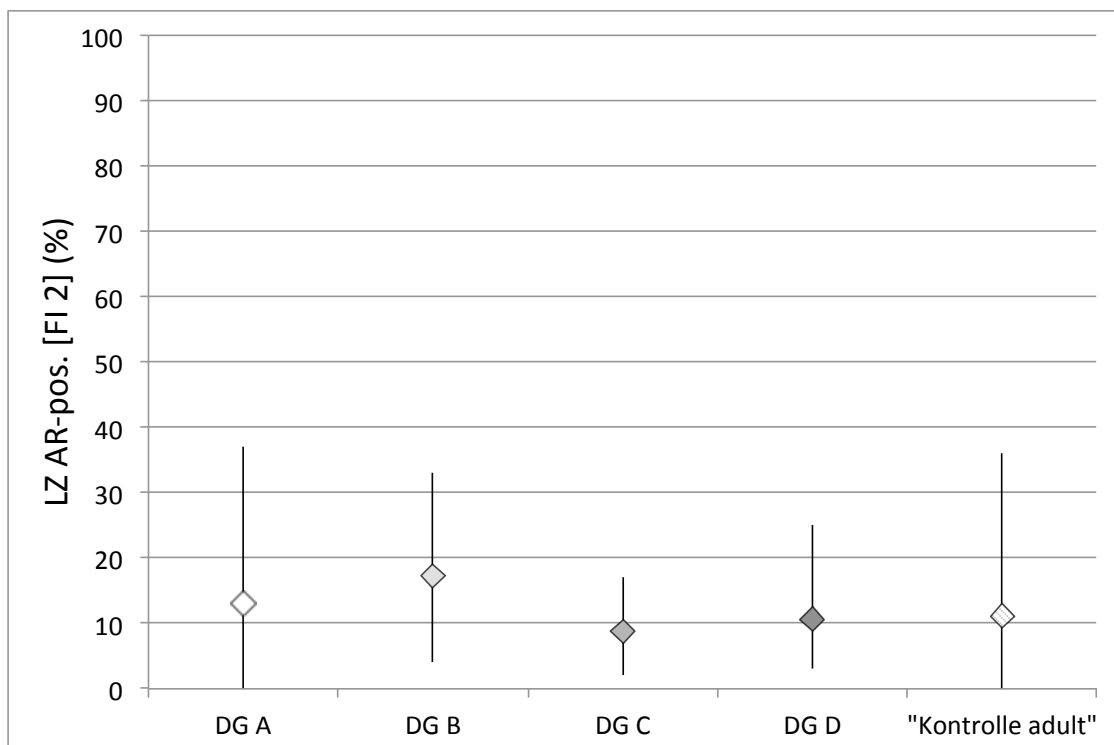


LZ AR-pos. FI(1)



LZ AR-pos. FI 1

Abbildung 4.18: Fortsetzung (Abbildungsbeschriftung siehe Abbildung 4.18, Seite 153)

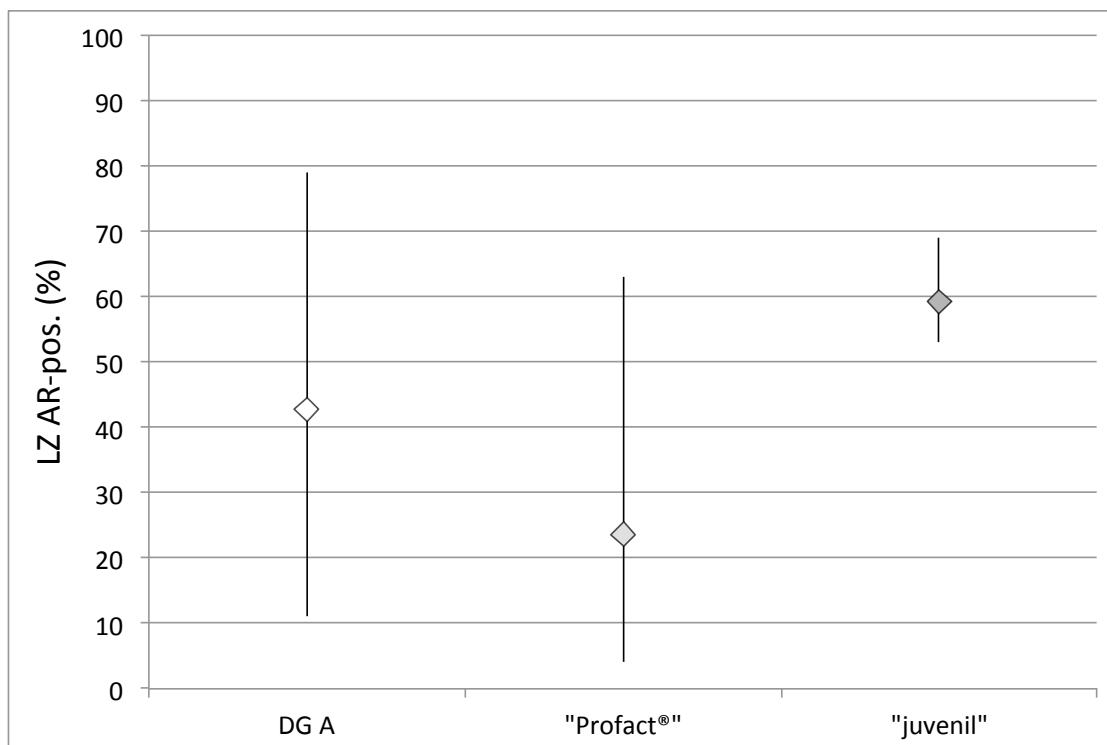


LZ AR-pos. FI 2

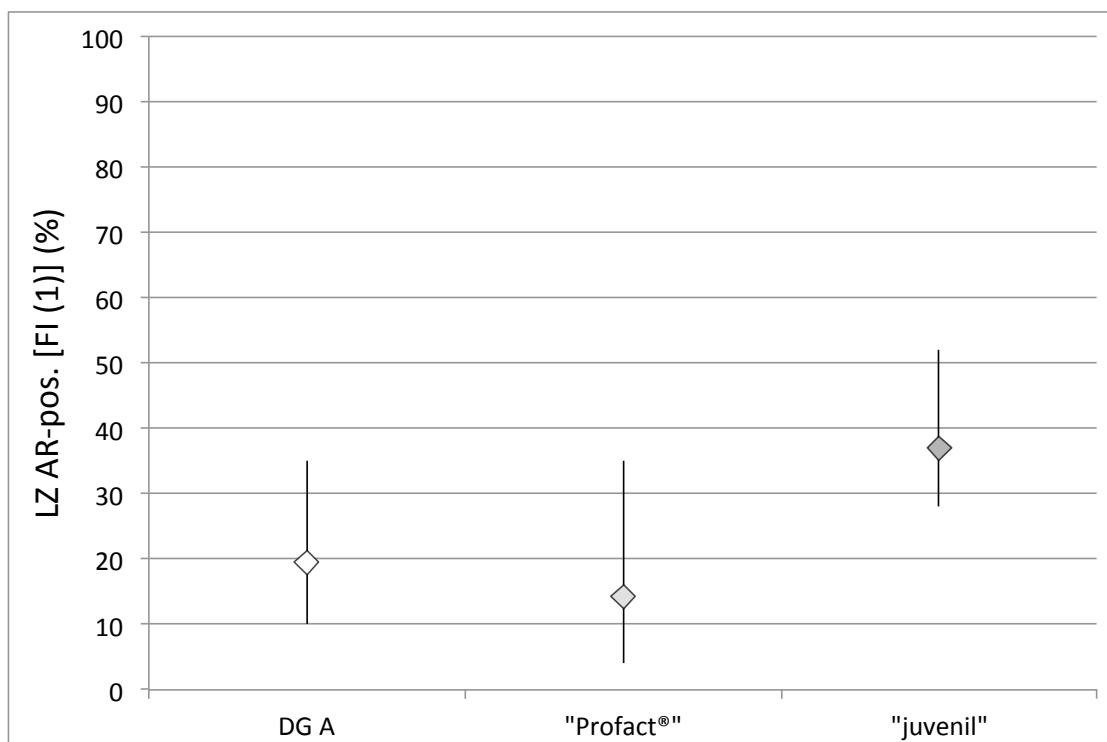
Abbildung 4.18: Fortsetzung (Abbildungsbeschriftung siehe Abbildung 4.18, Seite 153)

4.2.2.2.4.2 Versuchsgruppen DG A, „Profact®“ und „juvenil“ Der Anteil AR-positiver Leydigzellen lag bei der Versuchsgruppe „Profact®“ zwischen 4% und 63% und betrug im Mittel $23,7 \pm 34,1\%$. Er war damit niedriger als die für die Gruppe DG A ($42,8 \pm 35,8\%$) und „juvenil“ ($59,3 \pm 8,5\%$) ermittelten Werte; signifikante Unterschiede ergaben sich jedoch nicht.

Von den AR-positiven LZ wiesen circa 45% bis 62% die FI(1), 21% bis 32% die FI1 und 6% bis 30% die FI2 auf; Gruppeneffekte waren nicht erkennbar [siehe Tabelle 4.10 sowie Abbildung 4.19 (Seite 156 f.)].

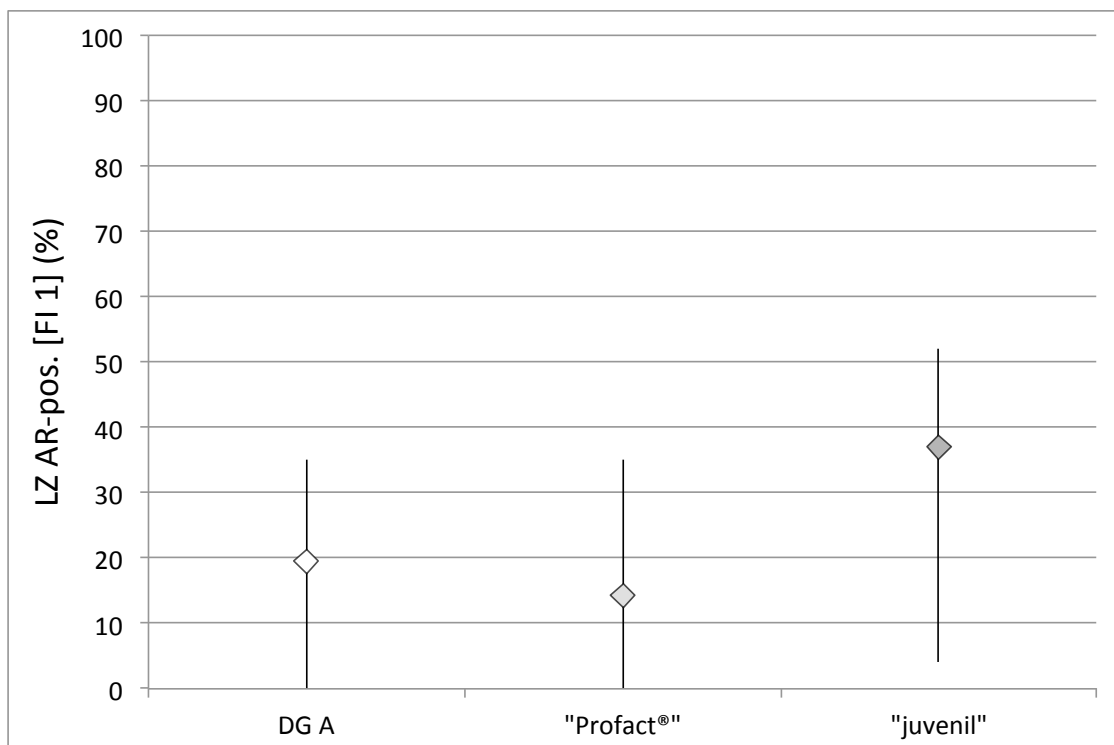


AR-pos.

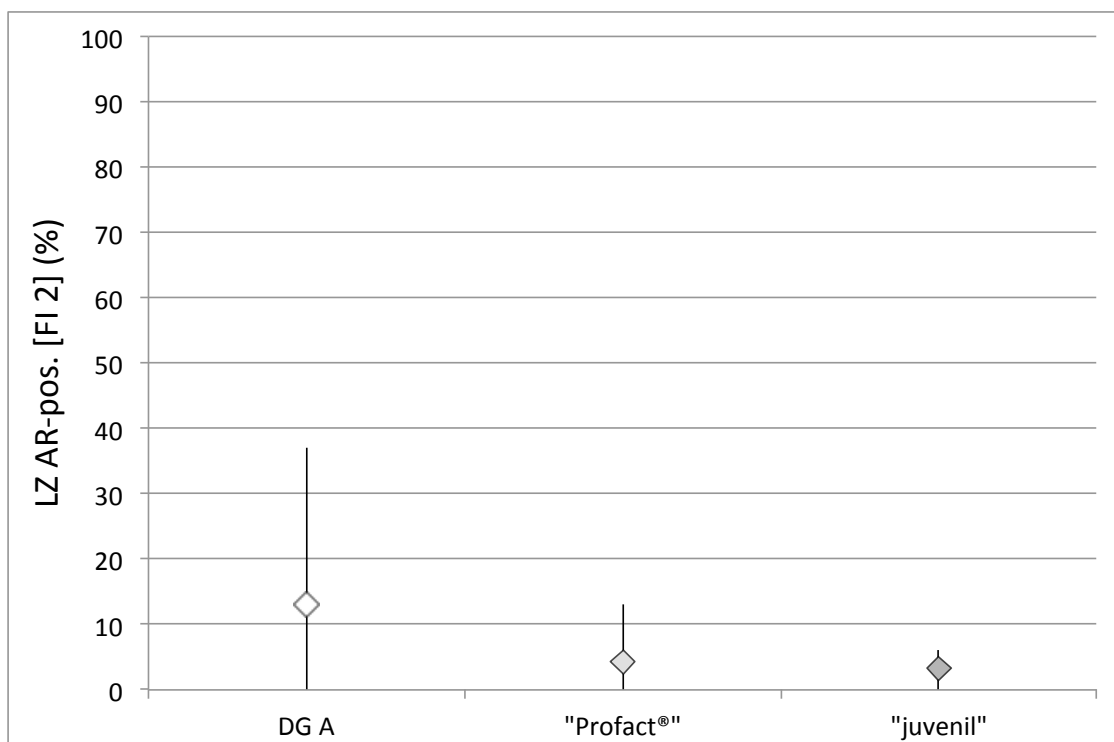


AR-pos. FI(1)

Abbildung 4.19: Prozentualer Anteil (%) der Androgenrezeptor-positiver Leydigzellen (AR-pos. LZ) sowie der AR-pos. LZ in den Färbeintensitäten (FI) (1), FI 1 und FI 2 der Versuchsgruppen „Gonazon®“ (DG A), „Profact®“ und „juvenil“ [\bar{x} ; min. - max.]



AR-pos. FI 1



AR-pos. FI 2

Abbildung 4.19: Fortsetzung (Abbildungsbeschriftung siehe Abbildung 4.19, Seite 156)

4.2.2.2.5 Expression des Androgenrezeptors (AR) in Abhängigkeit vom Tubulustyp

In die Auswertungen gingen sämtliche Tubuli seminiferi contorti des Tubulustyps (tt) a bis tt d₂ der Versuchsgruppen „Gonazon®“ und „Kontrolle adult“ ein. Die Beurteilung der zellulären Färbeintensität erfolgte wie in Kapitel 3.6.1.1.2 beschrieben. Die Ergebnisse im Hinblick auf die Sertolizellen und Spermatogonien sind in Tabelle 4.12 und Tabelle 4.11 wiedergeben.

Im Hinblick auf die tubuläre Entwicklung ergab sich eine positive signifikante Rangkorrelation nach Spearman für die Anzahl basal lokalisierter AR-positiver Sertolizellen ($r_s = 0,36$; $p < 0,0001$) sowie die zunehmende Färbeintensität der AR-positiven Sertolizellen ($r_s = 0,26$; $p < 0,0001$) und Spermatogonien ($r_s = 0,15$; $p = 0,01$).

Tabelle 4.11: Gesamtzahl (Σ) und Anzahl Androgenrezeptor-positiver (Σ AR-pos.) Spermatogonien (Spg) pro Tubulus seminiferus contortus-Querschnitt sowie mittlere Färbeintensität (FI) der AR-pos. Spg in Abhängigkeit des Tubulustyps (tt) a - tt d₂ [$\bar{x} \pm$ SD; min. - max.]

	Spg / Tubulusquerschnitt											
	Σ				AR-pos.							
					Σ				FI			
	\bar{x}	SD	min.	max.	\bar{x}	SD	min.	max.	\bar{x}	SD	min.	max.
tt a	10,83	6,12	0,00	23,00	2,58	3,08	0,00	11,00	0,32	0,28	0,00	1,00
tt b	12,05	9,05	0,00	46,00	2,00	2,44	0,00	14,00	0,36	0,30	0,00	1,00
tt c ₁	9,64	4,27	1,00	17,00	2,72	2,28	0,00	8,00	0,42	0,19	0,00	0,50
tt c ₂	15,59	7,43	5,00	34,00	1,82	1,63	0,00	4,00	0,44	0,30	0,00	1,00
tt c ₃	21,47	13,90	2,00	50,00	2,00	1,94	0,00	7,00	0,47	0,33	0,00	1,00
tt d ₁	13,47	12,40	2,00	38,00	2,33	1,80	0,00	6,00	0,43	0,26	0,00	1,00
tt d ₂	10,56	4,21	3,00	18,00	1,56	1,41	0,00	4,00	0,00	0,50	0,00	2,00
-					-				$r_s=0,1539$; $p=0,0123$			

r_s (Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman); p (Wahrscheinlichkeit)

Tabelle 4.12: Gesamtzahl (Σ) und Anzahl Androgenrezeptor-positiver (Σ AR-pos.) und AR-pos. basalständiger (Σ AR-pos. bas.) Sertolizellen (SZ) pro Tubulus seminiferus contortus-Querschnitt sowie mittlere Färbeintensität (FI) der AR-pos. SZ in Abhängigkeit der Tubulustypen (tt) a bis tt d₂ [$\bar{x} \pm$ SD; min. - max.]

SZ / Tubulusquerschnitt																
Σ						AR-pos.						AR-pos. bas.				
						Σ			FI							
\bar{x}		SD	min.	max.	\bar{x}	SD	min.	max.	\bar{x}	SD	min.	max.				
tt a	15,67	6,94	3,00	31,00	11,93	9,62	0,00	31,00	0,78	0,61	0,00	2,00	5,83	5,20	0,00	19,00
	14,87	5,01	4,00	30,00	12,44	6,65	0,00	27,00	0,96	0,59	0,00	2,00	8,97	6,00	0,00	22,00
tt c ₁	15,36	4,54	9,00	25,00	14,96	4,59	9,00	25,00	0,96	0,45	0,50	2,00	12,36	3,73	7,00	22,00
	15,06	4,02	9,00	20,00	15,06	4,02	9,00	20,00	1,38	0,55	0,50	2,00	12,71	3,75	4,00	18,00
tt c ₃	14,12	3,55	8,00	23,00	14,00	3,52	8,00	23,00	1,56	0,56	0,50	2,00	9,06	4,44	0,00	16,00
	14,53	2,70	10,00	20,00	14,40	2,75	10,00	20,00	1,57	0,56	0,50	2,00	10,27	3,88	4,00	18,00
tt d ₂	14,50	4,23	5,00	20,00	14,19	4,05	5,00	20,00	0,84	0,40	0,50	2,00	12,81	3,64	5,00	17,00
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
						$r_S=0,2584; p<0,0001$						$r_S=0,3641; p<0,0001$				

4.2.3 Expression des Androgenrezeptors (AR) auf mRNA-Ebene

4.2.3.1 RT-PCR

Abbildung 4.20 zeigt das Ergebnis der qualitativen RT-PCR.

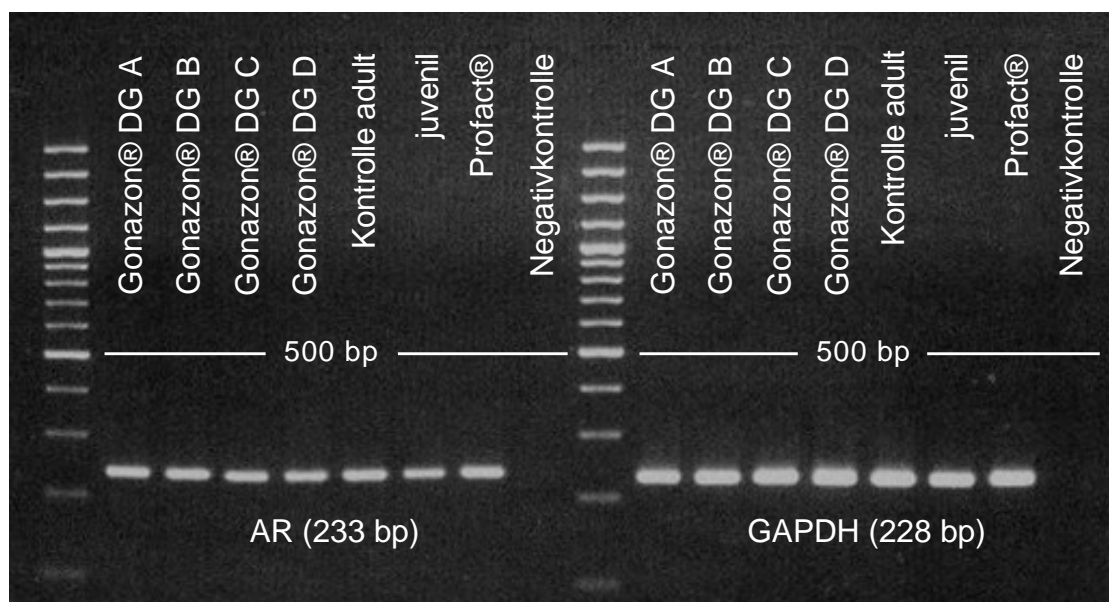


Abbildung 4.20: Konventionelle RT-PCR zum qualitativen Nachweis der Androgenrezeptor (AR)-mRNA unter Verwendung eines 100bp-DNA-Markers

Für alle Versuchsgruppen ergab sich eine spezifische Bande in der erwarteten Größe des AR von 233 bp. Auch die Bande des Referenzgens GAPDH lag bei allen untersuchten Gruppen gemäß den Erwartungen auf Höhe von 228 bp und bestätigte somit als Positivkontrolle die korrekte Durchführung der qualitativen RT-PCR.

4.2.3.1.1 Sequenzierung Die unter Verwendung der AR-Primer (for, rev) sequenzierten RT-PCR-Amplifikate (233 bp) wiesen eine 99 %ige Übereinstimmung mit den Basen 1301 → 1533 der *Canis lupus familiaris* AR mRNA, NCBI Referenzsequenz NM_001003053.1, Accession-Nummer NM_001003053 auf. Die Sequenzierung mittels GAPDH-Primer (for, rev) bestätigt eine zu 100 % identische Basenabfolge der RT-PCR-Produkte (228 bp) mit den Basen 340 → 567 der *Canis lupus familiaris* GAPDH mRNA, GenBank AB038240.1, Accession-Nummer AB038240.

4.2.3.2 RT-qPCR

Die Ergebnisse der Ratio R aller Versuchsgruppen sind in Tabelle 4.13 wiedergegeben.

Tabelle 4.13: Ratio R der relativen Genexpression des testikulären Androgenrezeptors (AR) [$\bar{x} \pm \text{SD}$; min. - max.]

		R_{AR}			
		\bar{x}	SD	min.	max.
„Gonazon [®] “	DG A	0,92 ^A	0,09	0,80	1,02
	DG B	0,93	0,24	0,72	1,19
	DG C	0,82	0,13	0,65	0,95
	DG D	0,89	0,17	0,65	1,09
„Kontrolle adult“		1,01	0,15	0,78	1,21
„Profact [®] “		0,92 ^A	0,06	0,85	0,96
„juvenil“		0,31 ^B	0,16	0,15	0,46

DatA I ¹⁾	ANOVA	n. s.
DatA II ²⁾	ANOVA	$p=0,0003 \rightarrow$ Tukey-Test: $p \leq 0,01$

¹⁾ DatA I (Datenanalyse I): Versuchsgruppen „Gonazon[®]“ und „Kontrolle adult“

²⁾ DatA II (Datenanalyse II): Versuchsgruppen „Gonazon[®]“ (DG A), „Profact[®]“, „juvenil“

	signifikant (p -Wert) / nicht signifikant (n.s.);
ANOVA (einfaktorielle Varianzanalyse)	$\left. \begin{array}{l} \text{Werte mit ungleichen Minuskeln (DatA I)} \\ \text{bzw. ungleichen Majuskeln (DatA II) un-} \\ \text{terscheiden sich signifikant} \end{array} \right\}$
Tukey-Test	

Die Berechnung basierte auf den auf einen Threshold von 200,00 angepassten C_T -Werten. Die zur Effizienzkorrektur nach PFAFFL (2001) herangezogenen Reaktionseffizienzen betrugen für das Zielgen $E_{(AR)}$ 1,80 und für das Referenzgen $E_{(GAPDH)}$ 1,73.

4.2.3.2.1 Versuchsgruppe „Gonazon®“ Zwischen den Gruppen DG A bis DG D sowie der Versuchsgruppe „Kontrolle adult“ zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der relativen Gen-Expression des AR-Rezeptors (siehe Abbildung 4.21).

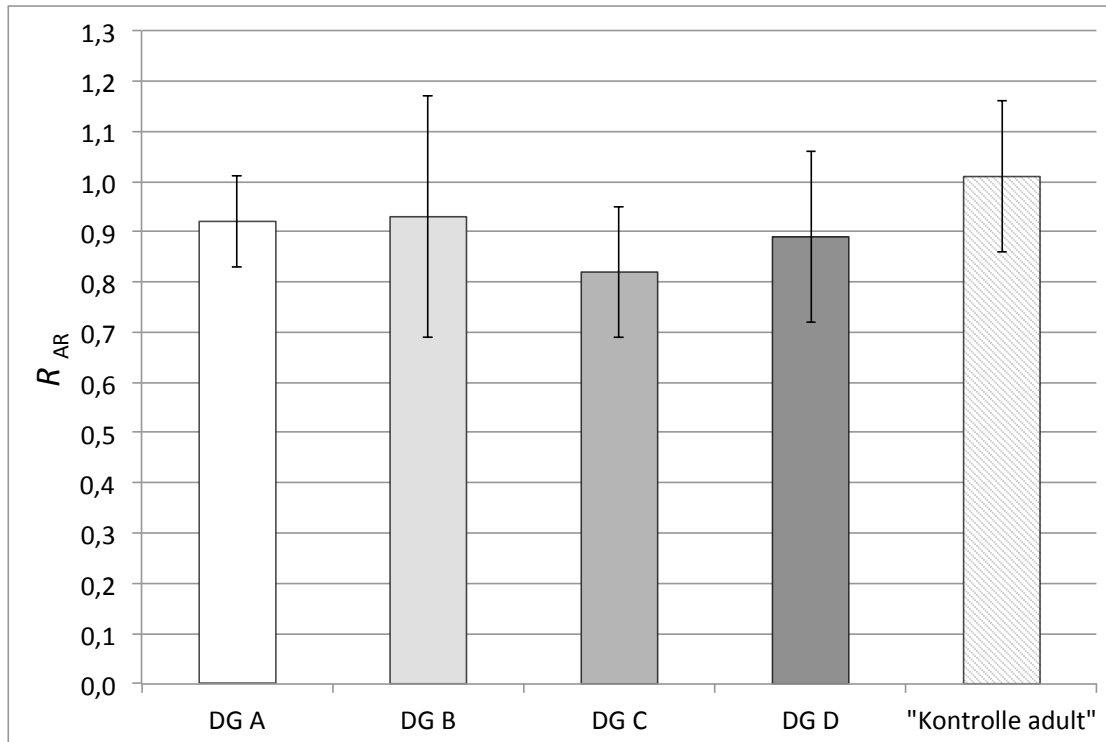


Abbildung 4.21: Ratio R der relativen Gen-Expression des testikulären Androgenrezeptors (AR) der Versuchsgruppen „Gonazon®“ und „Kontrolle adult“ [$\bar{x} \pm SD$]

4.2.3.2.2 Versuchsgruppen DG A, „Profact®“ und „juvenil“ Die Versuchsgruppe „juvenil“ wies mit $0,31 \pm 0,16$ eine gegenüber den Versuchsgruppe „Gonazon®“ Gruppe DG A ($0,92 \pm 0,09$) und „Profact®“ ($0,92 \pm 0,06$) signifikant ($p \leq 0,01$) niedrigere Ratio R auf (siehe Tabelle 4.13 und Abbildung 4.22). Ein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen „Gonazon®“ DG A und „Profact®“ ergab sich nicht.

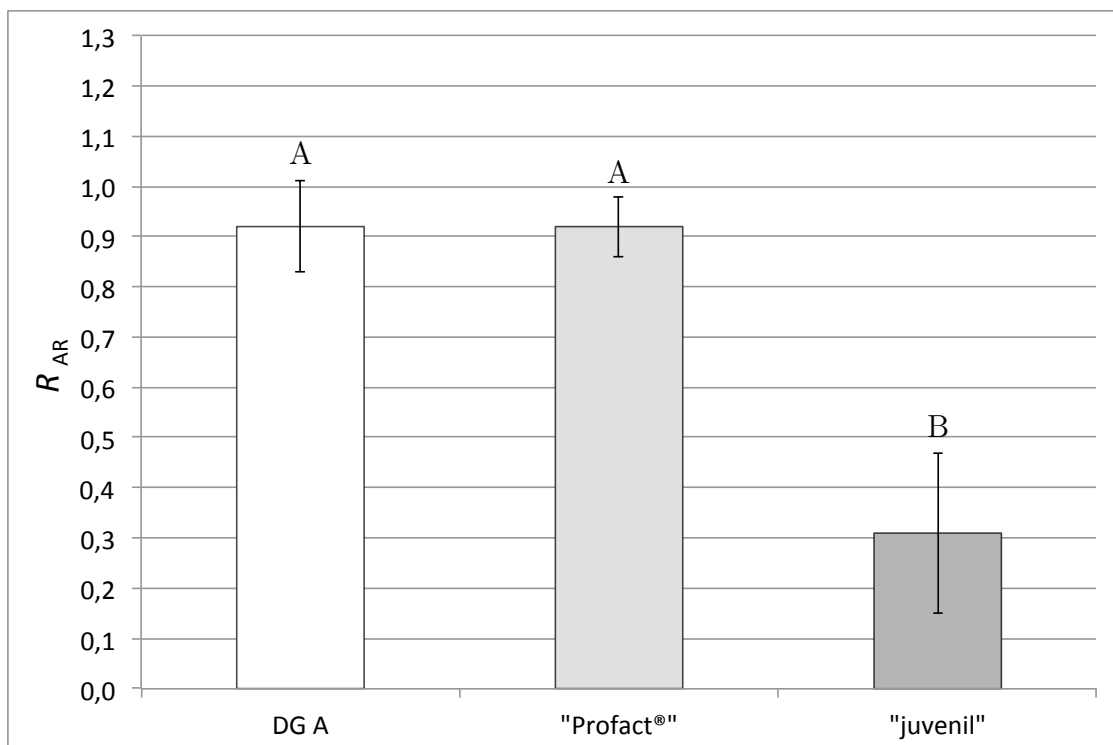


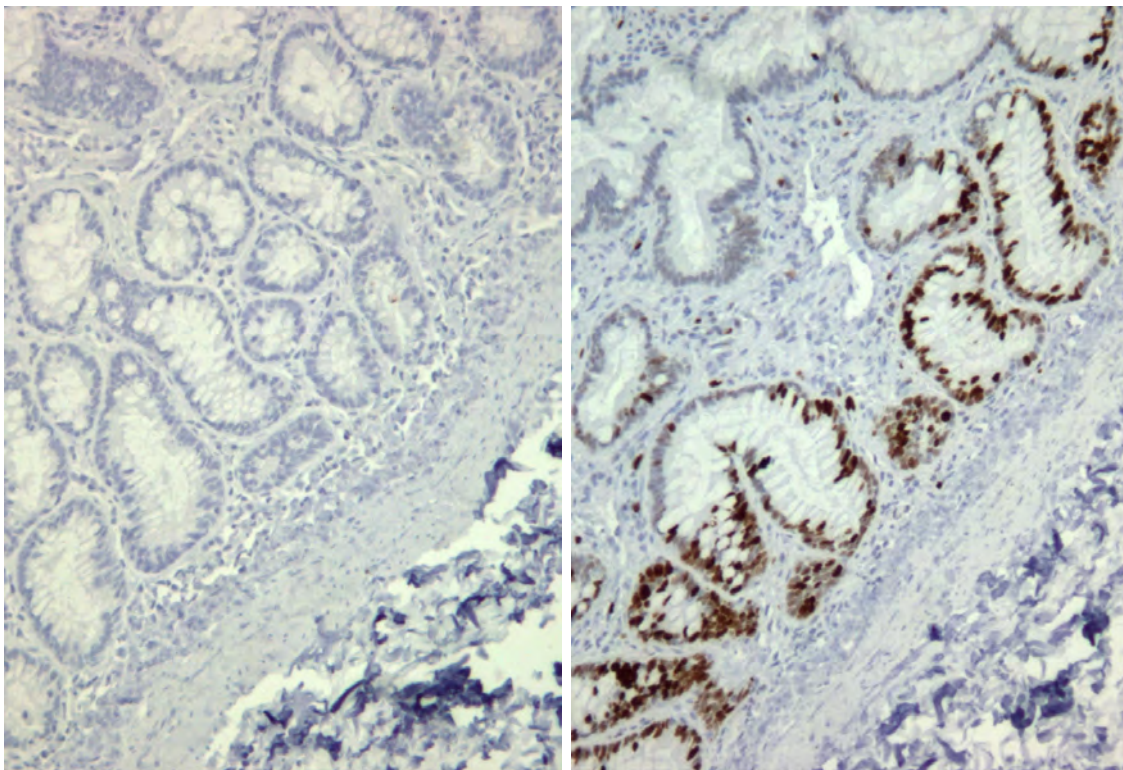
Abbildung 4.22: Ratio R der relativen Gen-Expression des testikulären Androgenrezeptors (AR) der Versuchsgruppen „Gonazon®“ (DG A), „Profact®“ und „juvenil“ [$\bar{x} \pm SD$; Tukey-Test: $p \leq 0,01$; Werte mit unterschiedlichen Majuskeln unterscheiden sich signifikant]

4.3 Ki-67

4.3.1 Immunhistochemische Untersuchung

4.3.1.1 Qualitativer Nachweis der Expression des Ki-67 in Kontrollgewebe

In einem Vorversuch mit caninem Intestinalgewebe gelang die Detektion des Proliferationsmarkers Ki-67 ausschließlich in den hochgradig teilungsaktiven Kryptenzellen (siehe Abbildung 4.23). Die Isotypenkontrolle zeigte kein immunhistochemisches Signal.



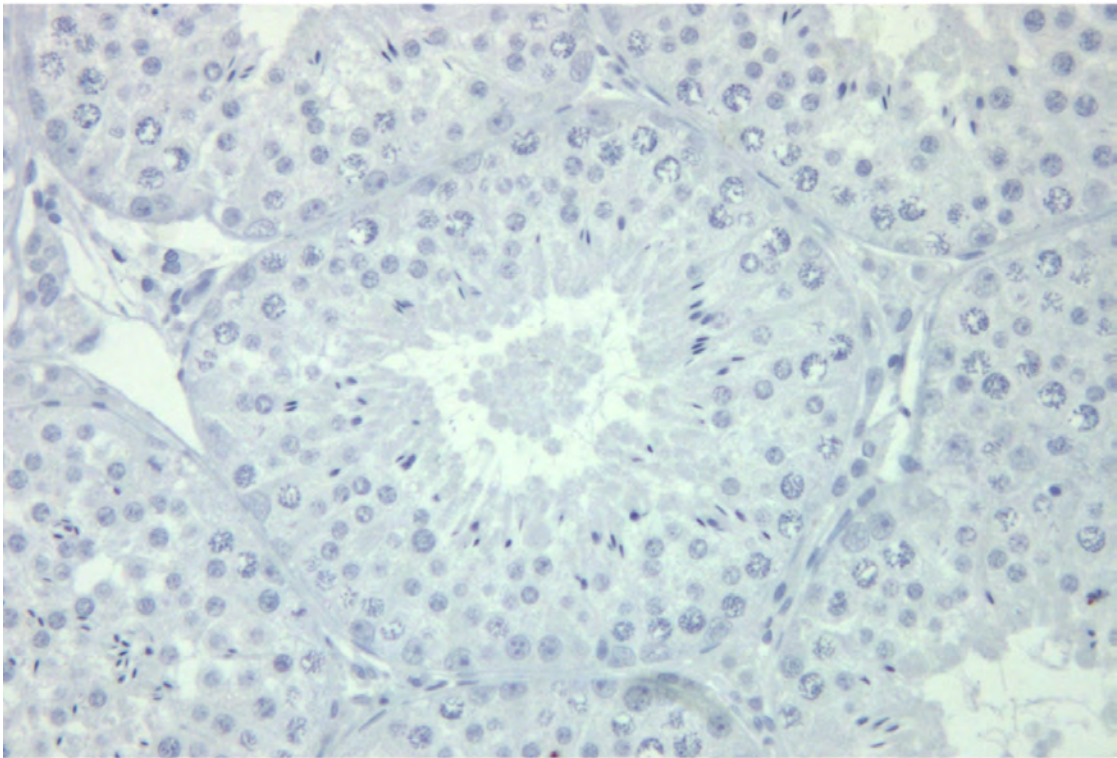
IK Ki-67

Ki-67

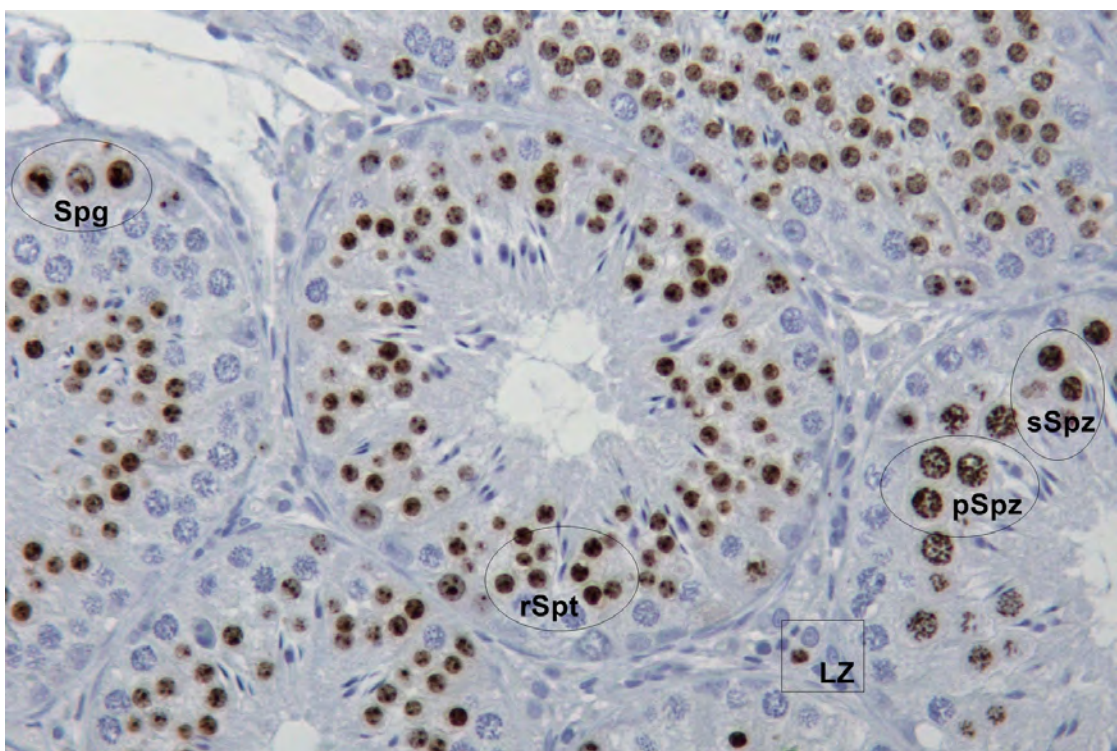
Abbildung 4.23: Isotypenkontrolle (IK) und immunhistochemischen Färbung des Ki-67 im caninen Intestinalgewebe (100x)

4.3.1.2 Definition der erfassten Ki-67-positiven Zellen

Während die Isotypenkontrollen keinerlei Färbungen aufwiesen, ergab die immunhistochemische Färbung des Ki-67 (siehe Abbildung 4.24) überwiegend positive Signale in den



IK Ki-67



Ki-67

Abbildung 4.24: Isotypenkontrolle (IK) und immunhistochemische Färbung des Ki-67 im caninen Hodengewebe (200x) [Spg (Spermatogonien), pSpz/sSpz (primäre/sekundäre Spermatozyten), rSpt (runde Spermatiden), LZ (Leydigzellen)]

intratubulär gelegenen Spermatogonien (Spg), den primären und sekundären Spermatozyten (pSpz, sSpz) und den runden Spermatischen (rSpt) sowie vereinzelt auch in den intertubulär gelegenen interstitiellen Leydigzellen (LZ).

Bei der weiteren Auswertung wurden im Hinblick auf ihre Funktion als Ausgangszellen der Spermatogenese beim geschlechtsreifen Tier jedoch ausschließlich die Spermatogonien berücksichtigt.

4.3.1.3 Expression des Ki-67 in den Spermatogonien

Die Ergebnisse zur immunhistochemischen Expression des Ki-67 in den Spermatogonien sind für alle Versuchsgruppen, einschließlich der Gruppe „Kontrolle adult“, in der Tabelle 4.14 dargestellt.

4.3.1.3.1 Versuchsgruppe „Gonazon®“ Die mittlere Gesamtzahl an Spermatogonien pro Tubulusquerschnitt lag für die Gruppen DG A bis DG D in einem Bereich von $6,61 \pm 2,27$ bis $14,76 \pm 5,94$. Unter Einbeziehung der Versuchsgruppe „Kontrolle adult“ wurde mit $p = 0,06$ ein Effekt der Gruppe nur knapp verfehlt. Jedoch wies die DG A gegenüber den übrigen Gruppen eine tendenziell erniedrigte Anzahl an Spermatogonien auf (siehe Tabelle 4.14 und Abbildung 4.25).

Für die Ki-67-exprimierenden Spermatogonien ergab sich mit $p < 0,0001$ ein hochsignifikanter Einfluss der Gruppe. Im paarweise Vergleich mittels Tukey-Test unterschieden sich sowohl DG A von DG C, DG D und der „Kontrolle adult“ mit $p \leq 0,01$ als auch DG B von DG D und der „Kontrolle adult“ mit $p \leq 0,05$ (siehe Abbildung 4.25).

Tabelle 4.14: Gesamtzahl (Σ) [$\bar{x} \pm \text{SD}$; min. - max.] und Anzahl Ki-67-positiver (Ki-67-pos.) [$\bar{x}_{geom.}$ (SF); min. - max.] Spermatogonien (Spg) pro Tubulus seminiferus contortus-Querschnitt

			Spg / Tubulusquerschnitt							
			Σ				Ki-67-pos.			
			\bar{x}	SD	min.	max.	$\bar{x}_{geom.}$	(SF)	min.	max.
„Gonazon®“	DG A		6,61	2,27	4,55	9,35	0,04 ^a	2,00	0,03	0,10
	DG B		11,30	4,29	7,25	15,80	0,34 ^{a,b}	6,01	0,05	1,75
	DG C		14,76	5,94	9,25	23,25	1,32 ^{b,c}	4,99	0,15	11,25
	DG D		12,47	2,39	9,00	15,55	5,61 ^c	1,66	2,50	8,39
„Kontrolle adult“			12,97	2,68	10,05	15,60	6,64 ^c	1,38	4,30	10,30
„Profact®“			4,17	0,68	3,55	4,90	0,00	1,00	0,00	0,00
„juvenil“			-	-	-	-	-	-	-	-
DatA I ¹⁾ ANOVA n. s.							$p < 0,0001 \rightarrow$ Tukey-Test: $p \leq 0,05$ (DG B vs. DG D, „Kontrolle adult“) und $p \leq 0,01$ (übrige Signifikanzen)			
DatA II ²⁾ t-Test n.s.							-			
ext WMWT -							n.s.			

¹⁾ DatA I (Datenanalyse I): Versuchsgruppen „Gonazon®“ und „Kontrolle adult“

²⁾ DatA II (Datenanalyse II): Versuchsgruppen „Gonazon®“ (DG A), „Profact®“, „juvenil“

ANOVA (einfaktorielle Varianzanalyse)	} signifikant (p -Wert) / nicht signifikant (n.s.); Werte mit ungleichen Minuskeln (DatA I) bzw. ungleichen Majuskeln (DatA II) un- terscheiden sich signifikant
t-Test	
ext WMWT (exakter Wilcoxon-Mann-Whitney-Test)	
Tukey-Test	

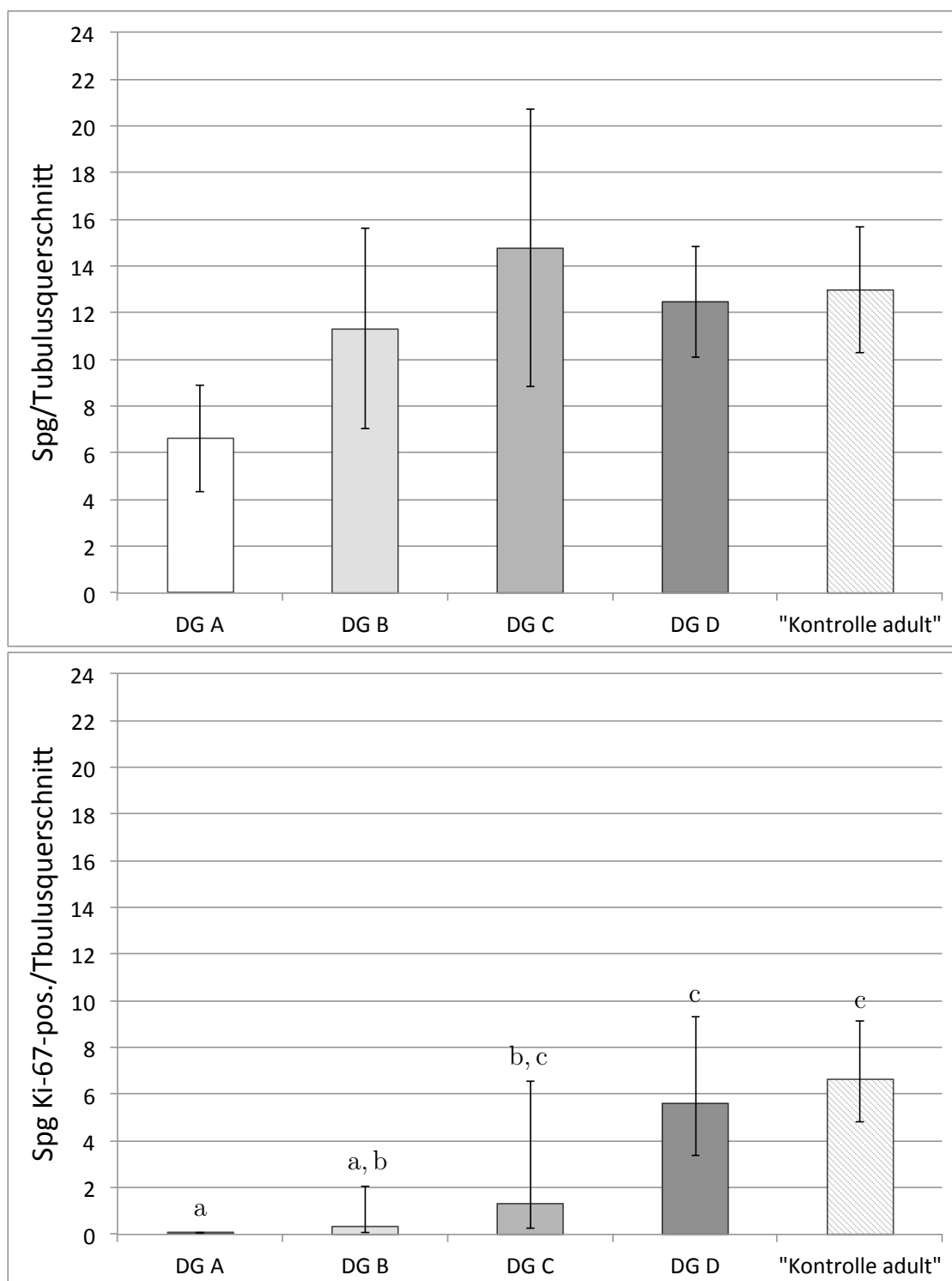


Abbildung 4.25: Gesamtzahl [$\bar{x} \pm \text{SD}$] und Anzahl Ki-67-positiver (Ki-67-pos.) [$\bar{x}_{\text{geom.}}$ (SF)]; Tukey-Test: $p \leq 0,05$ (DG B vs. DG D, „Kontrolle adult“) und $p \leq 0,01$ (übrige Signifikanzen); Werte mit unterschiedlichen Minuskeln unterscheiden sich signifikant] Spermatogonien (Spg) pro Tubulus seminiferus contortus-Querschnitt der Versuchsgruppen „Gonazon®“ und „Kontrolle adult“

4.3.1.3.2 Versuchsgruppen DG A, „Profact®“ und „juvenil“ Mit im Mittel $4,17 \pm 0,68$ Spermatogonien pro tubulärem Querschnitt unterschied sich die Versuchsgruppe „Profact®“, wie aus Tabelle 4.14 und Abbildung 4.26 ersichtlich, nicht von der Gruppe DG A ($6,61 \pm 2,27$). Die Versuchsgruppe „juvenil“ wies lediglich frühe Sertolizellen sowie große und kleine, basal oder zentral gelegene Gonozyten, nicht aber Spermatogonien auf. Eine Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 war bei den Spermatogonien der Versuchsgruppe DG A kaum, bei denen der Gruppe „Profact®“ nicht erkennbar. Bei der Versuchsgruppe „juvenil“ war, mit Ausnahme eines in einem basalen Gonozyten lokalisierten einzelnen positiven Signals, keine Expression des Ki-67-Antigens darstellbar.

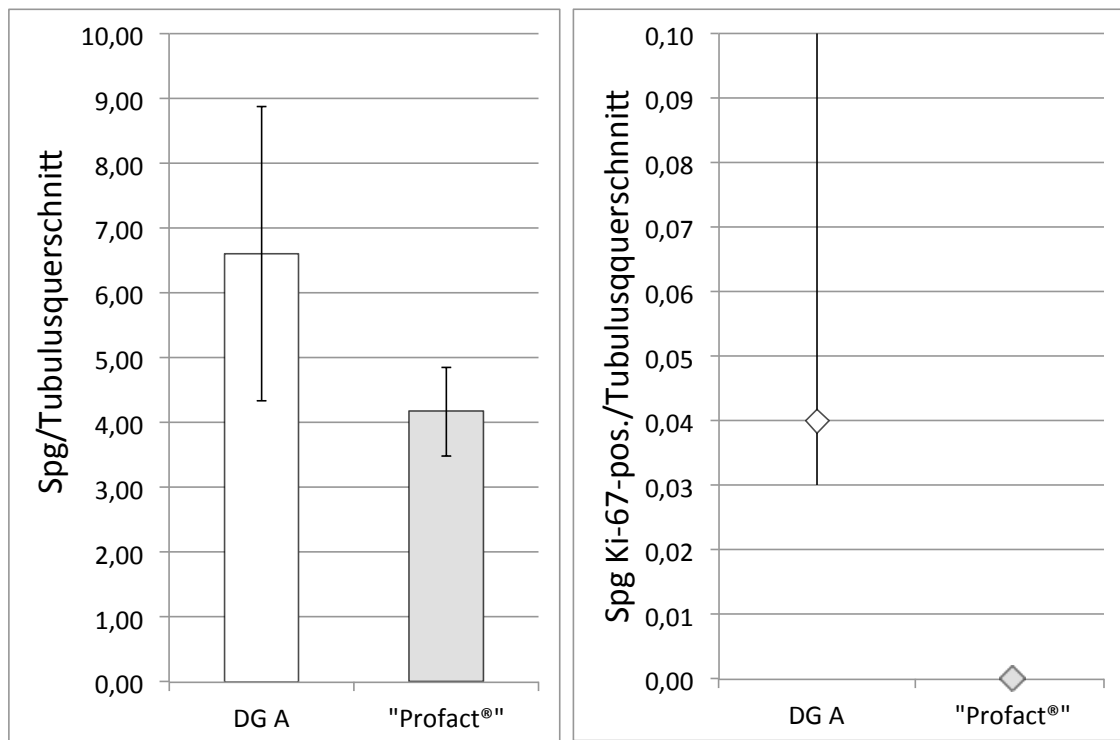


Abbildung 4.26: Gesamtzahl [$\bar{x} \pm SD$] und Anzahl Ki-67-positiver (Ki-67-pos.) [$\bar{x}_{geom.}$; min. - max.] Spermatogonien (Spg) pro Tubulus seminiferus contortus-Querschnitt der Versuchsgruppen „Gonazon®“ (DG A) und „Profact®“

4.3.1.4 Expression des Ki-67 in Abhängigkeit des Tubulustyps

Die Ergebnisse zur Expression des Ki-67 in Abhängigkeit des Tubulustyps zeigt Tabelle 4.15. Die der Auswertung zugrunde liegenden Tubulustypen tt a bis tt d₂ waren ausnahmslos in der Versuchsgruppe „Gonazon®“ Gruppe DG A bis DG C anzutreffen. Der Grad der Färbeintensität erfuhr keine Berücksichtigung.

Der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman r_S zeigt einen signifikanten positiven Zusammenhang zwischen den Tubulustypen tt a bis tt d₂ und der Anzahl sämtlicher ($r_S = 0,281$; $p < 0,0001$) bzw. Ki-67-positiver Spermatogonien ($r_S = 0,302$; $p < 0,0001$).

Den Anteil an Tubuli seminiferi contorti mit Ki-67-exprimierenden Spermatogonien bezogen auf die verschiedenen Tubulustypen (tt) zeigt Abbildung 4.27. Der Pearson-Chi-Quadrat-Test ließ einen signifikanten ($p < 0,0001$) Zusammenhang erkennen. Es zeigte sich ein monoton steigender Zusammenhang zwischen dem Tubulustyp (tt) und dem Anteil von Tubulusquerschnitten mit Ki-67-pos. Spg bis zum tt c₃.

Tabelle 4.15: Gesamtzahl (Σ) und Anzahl Ki-67-positiver (Ki-67-pos.) Spermatogonien (Spg) pro Tubulus seminiferus contortus-Querschnitt in Abhängigkeit des Tubulustyps (tt) a - tt d₂ [$\bar{x} \pm SD$; min. - max.]

	Spg / Tubulusquerschnitt							
	Σ				Ki-67-pos.			
	\bar{x}	SD	min.	max.	\bar{x}	SD	min.	max.
tt a	8,28	4,32	2,00	23,00	0,35	1,14	0,00	6,00
tt b	11,24	10,24	0,00	61,00	1,35	4,17	0,00	29,00
tt c ₁	10,00	5,53	3,00	19,00	1,69	3,28	0,00	7,00
tt c ₂	16,05	4,55	9,00	26,00	3,95	5,24	0,00	16,00
tt c ₃	21,06	8,59	5,00	30,00	6,63	7,23	0,00	14,00
tt d ₁	20,00	16,34	1,00	40,00	0,38	1,06	0,00	3,00
tt d ₂	10,44	6,25	1,00	24,00	2,39	4,15	0,00	17,00
$r_S = 0,2812$; $p < 0,0001$					$r_S = 0,3015$; $p < 0,0001$			

r_S (Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman); p (Wahrscheinlichkeit)

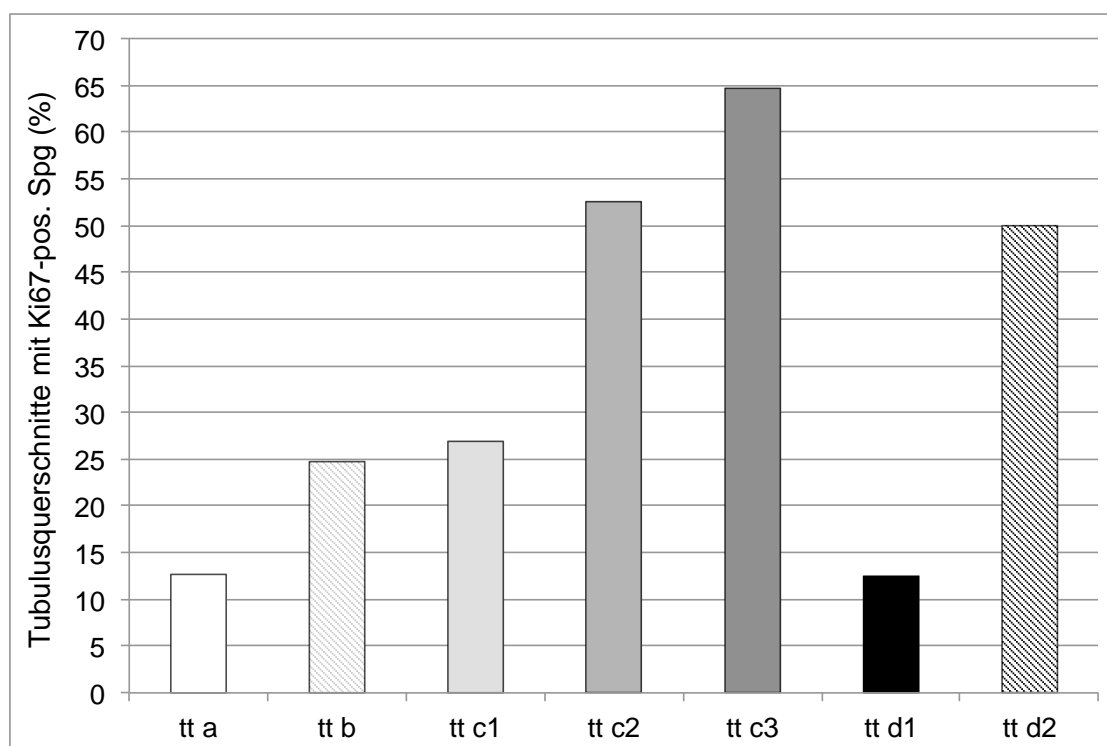


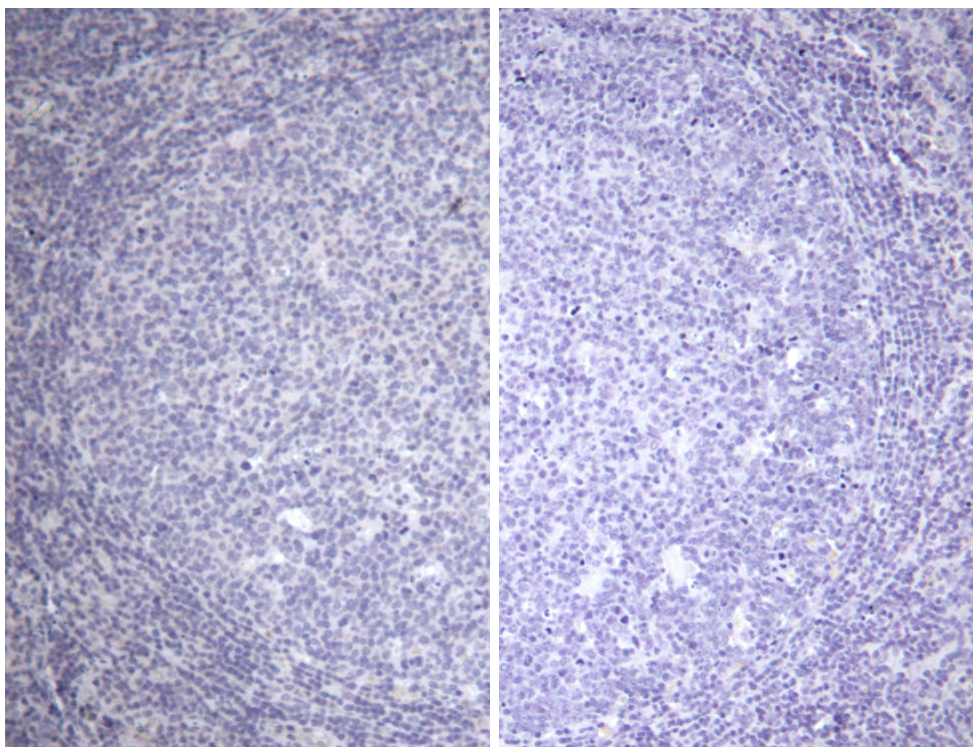
Abbildung 4.27: Prozentualer Anteil (%) an Tubuli seminiferi contorti-Querschnitten mit Ki-67-positiven Spermatogonien (Ki-67-pos. Spg) bezogen auf die Tubulustypen (tt) a bis tt d₂

4.4 Caspase-3

4.4.1 Expression der Caspase-3 auf Proteinebene

4.4.1.1 Histochemischer Methodenvergleich

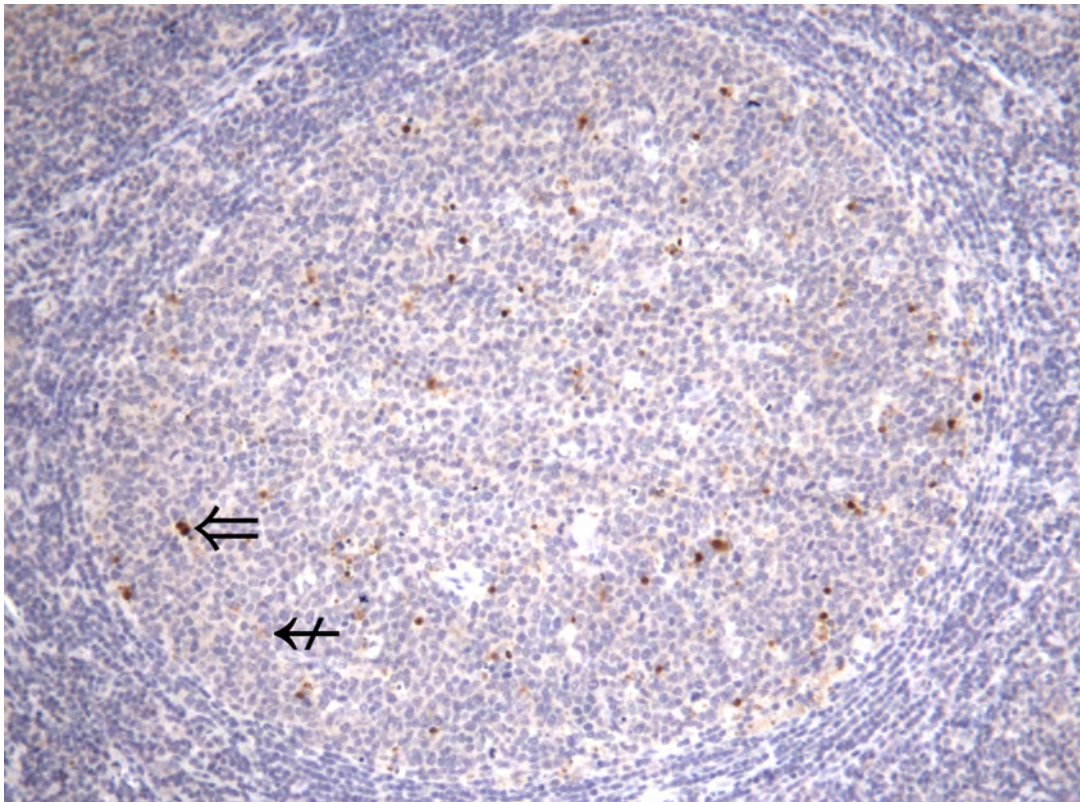
Da in einer ersten Versuchsreihe bei Anwendung eines Antikörpers gegen aktivierte Caspase-3 der Verdacht auf unspezifische Färbungen aufkam, erfolgte zur Überprüfung der Spezifität die vergleichende Anwendung der immunhistochemischen Darstellung aktivierter Caspase-3 und der TUNEL-Methode an einem caninen Lymphknoten. Während in den Negativkontrollen (siehe Abbildung 4.28) keine Anfärbungen sichtbar waren, zeigten sich in beiden Methoden sowohl schwache, offensichtlich unspezifische Farbniederschläge als auch farbintensive, zelluläre apoptotische Signale (siehe Abbildung 4.29).



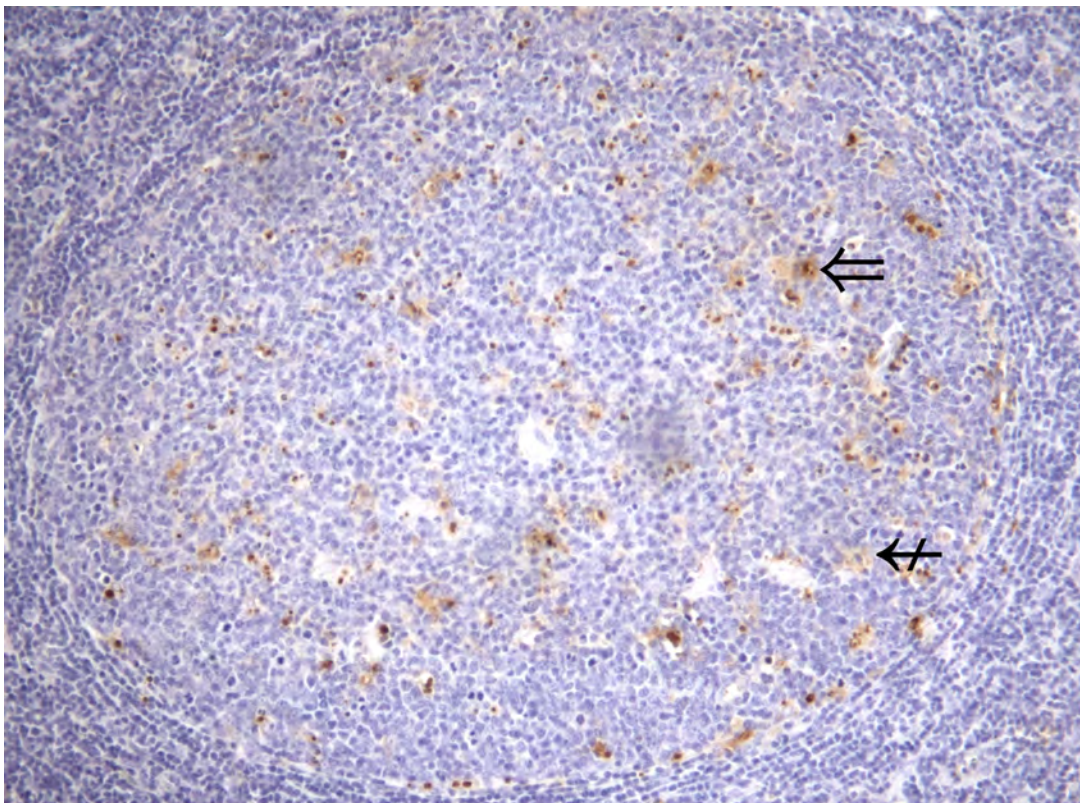
NK IHC aktivierte Caspase-3

NK TUNEL (ApopTag®)

Abbildung 4.28: Negativkontrollen (NK) des Methodenvergleiches von Immunhistochemie (IHC) der aktivierten Caspase-3 und TUNEL (ApopTag®) in einem als Kontrollgewebe verwendeten caninen Lymphknotens (100 x)



IHC (aktivierte Caspase-3)



TUNEL (ApopTag®)

Abbildung 4.29: Methodenvergleich von Immunhistochemie (IHC) der aktivierten Caspase-3 und TUNEL (ApopTag®) in einem als Kontrollgewebe verwendeten caninen Lymphknoten (100 x) [⇐ (spezif.) / ⇏ (unspezif. Signal)]

Die annähernd identische Häufung und Lokalisation der intensiv gefärbten apoptotischen Zellen ließ auf die Spezifität dieser immunhistochemischen Signale schließen.

Aufgrund des annähernd identischen Färbeverhaltens beider Methoden sowie im Hinblick auf die Erfassung der Caspase-3 auf mRNA-Ebene (siehe Kapitel 4.4.3) erfolgte zur weiteren Charakterisierung der Apoptose die Darstellung der aktivierten Caspase-3 mittels Immunhistochemie.

4.4.2 Immunhistochemie aktivierte Caspase-3

Das im caninen Lymphknoten beobachtete unspezifische Färbeverhalten zeigte sich im Hodengewebe des Hundes in verstärktem Umfang. Bereits die mit einem unspezifischen Kontrollserum behandelten Negativkontrollen (NK) wiesen vereinzelt amorphe, hell- bis dunkelbraune, unspezifische Färbungen auf (siehe Abbildung 4.30).

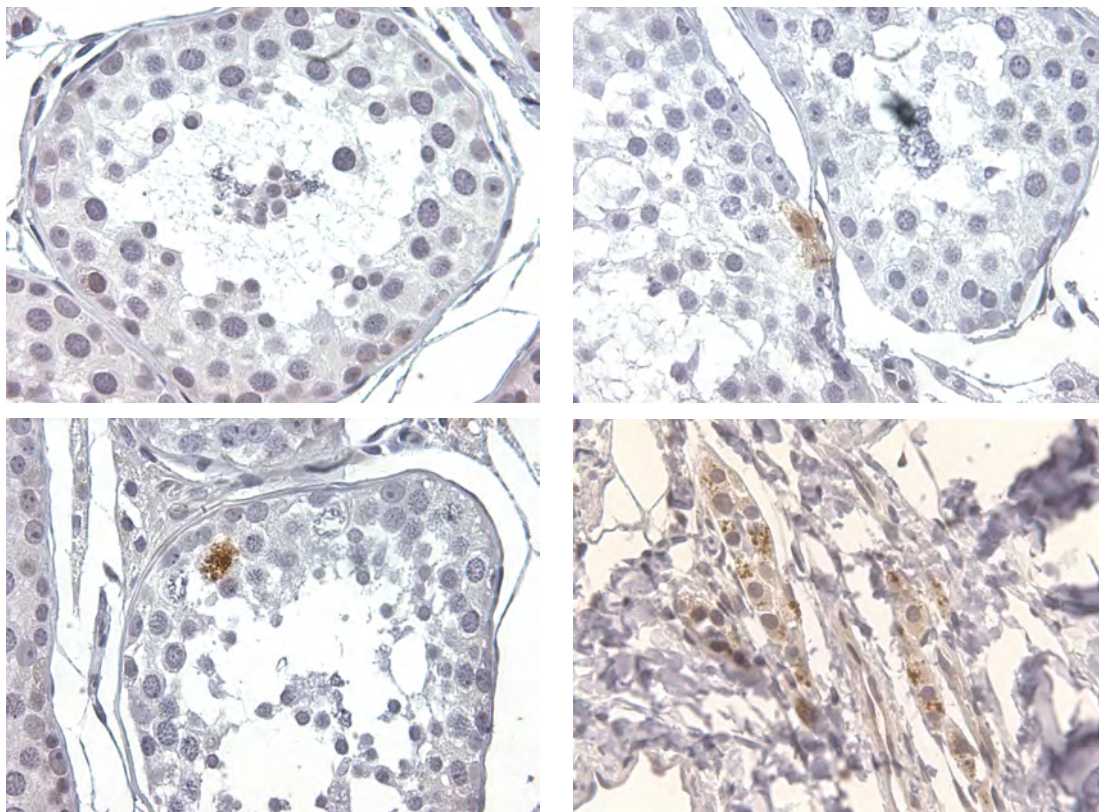


Abbildung 4.30: Immunhistochemische Negativkontrolle (NK) der aktivierten Caspase-3 im caninen Hoden ohne und mit unspezifischen Farbreaktionen (400 x)

Aus diesem Grund wurden bei den mit dem Primärantikörper gegen aktivierte Caspase-3 behandelten Gewebeschnitten lediglich, wie in Abbildung 4.31 dargestellt, intensiv braun gefärbte Zellen als positiv identifiziert.

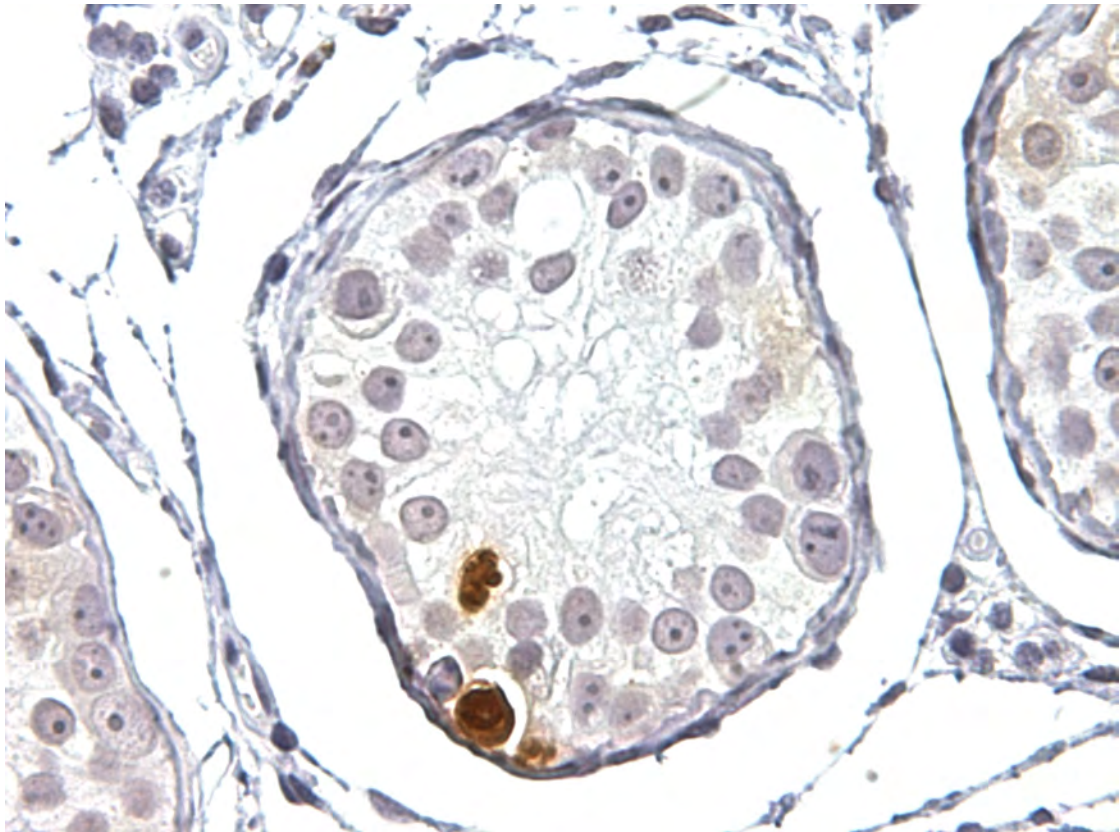


Abbildung 4.31: Immunhistochemische Färbung der aktivierten Caspase-3 im caninen Hoden mit als positiv bewerteter Farbreaktion (400 x)

4.4.2.1 Expression der aktivierten Caspase-3

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung des intra- und intertubulär gelegenen aktivierten Caspase-3-Antigens sind in Tabelle 4.16 zusammengefasst.

Tabelle 4.16: Mittlere Anzahl aktivierte Caspase-3-positiver Zellen pro 36 Gesichtsfeldern (400 x) [$\bar{x} \pm \text{SD}$; min. - max.]

		aktiv. Caspase-3-pos. Zellen			
		\bar{x}	SD	min.	max.
„Gonazon®“	DG A	4,75	2,63	1	7
	DG B	3,33	2,08	1	5
	DG C	5,33	2,66	0	7
	DG D	3,00	3,16	0	8
„Kontrolle adult“		1,00	0,71	0	2
„Profact®“		5,33	4,04	1	9
„juvenil“		1,33	0,58	1	2

4.4.2.1.1 Versuchsgruppe „Gonazon®“ Die mittlere Anzahl der pro 36 Gesichtsfelder beobachteten immunhistochemischen Signale variierte im Mittel zwischen $3,00 \pm 3,16$ und $5,33 \pm 2,66$. Mit $1,00 \pm 0,71$ lag die Zahl apoptotischer Ereignisse in der „Kontrolle adult“ vergleichsweise niedrig (siehe Tabelle 4.16).

4.4.2.1.2 Versuchsgruppen DG A, „Profact®“ und „juvenil“ Wie aus Tabelle 4.16 hervorgeht, entsprach die bei der Versuchsgruppe „Profact®“ ($5,33 \pm 4,04$) vorliegende Anzahl apoptotischer Signale annähernd der in Gruppe DG A ($4,75 \pm 2,63$) beobachteten Ergebnisse. Im Gegensatz dazu waren in der Versuchsgruppe „juvenil“ deutlich weniger, pro Tier lediglich 1 bis 2, im Mittel $1,33 \pm 0,58$ apoptotische Zelldegenerationen detektierbar.

4.4.3 Expression der Caspase-3 auf mRNA-Ebene

4.4.3.1 RT-PCR

Sowohl für die Versuchsgruppen „Gonazon®“, „Profact®“ und „juvenil“ als auch die „Kontrolle adult“ waren ausschließlich Amplifikate in der erwarteten Größe von 593 bp nachweisbar (siehe Abbildung 4.32). Eine entsprechende Expression des Referenzgens GAPDH auf Höhe von 228 bp ließ auf einen ungestörten Ablauf der RT-PCR schließen.

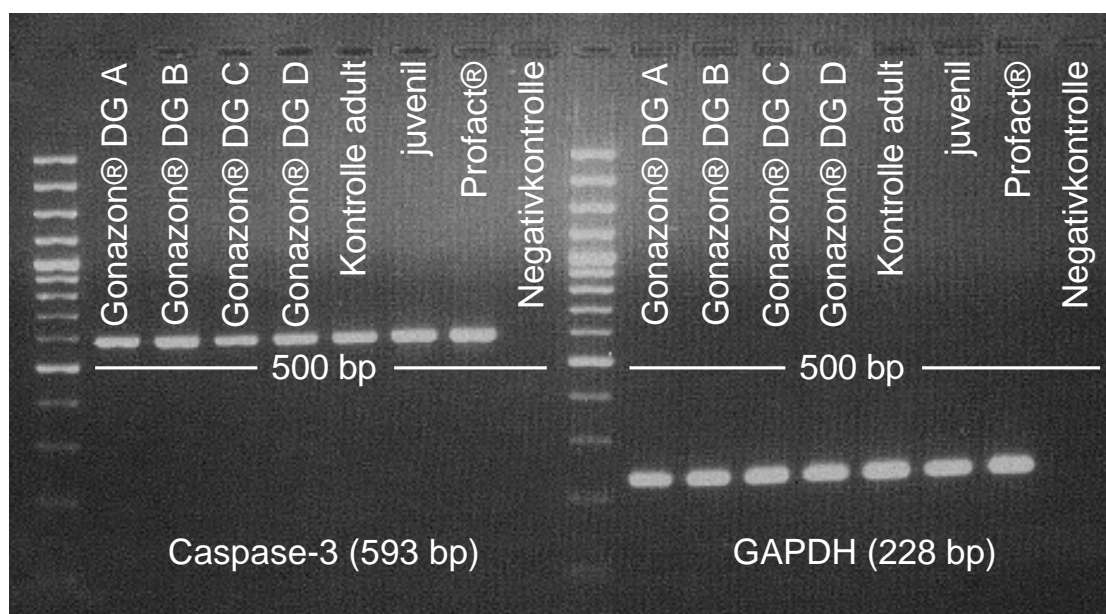


Abbildung 4.32: Konventionelle RT-PCR zum qualitativen Nachweis der Caspase-3-mRNA unter Verwendung eines DNA-100bp-Markers

4.4.3.1.1 Sequenzierung Die unter Verwendung der Caspase-3-Primer (for, rev) durchgeführte Sequenzierung der 593 bp großen RT-PCR-Amplifikate gelang nur unvollständig. Die sequenzierten Teilstücke umfassten mit einer Übereinstimmung von 92 % (Caspase-3-Primer for) bzw. 100 % (Caspase-3-Primer rev) die Basen 400 → 530 und 629 → 896 der NCBI Referenzsequenz NM_001003042.1., Accession-Nummer NM_001003042.

Das Sequenzierungsergebnis der RT-PCR-Produkte unter Verwendung der Primer GAPDH (for, rev) ist in Kapitel 4.2.3.1.1 beschrieben.

4.4.3.2 RT-qPCR

Die Ergebnisse der RT-qPCR sind in Tabelle 4.17 wiedergegeben.

Die Berechnung der relativen Genexpression der Caspase-3 erfolgt gemäß der in Kapitel 3.8.3.1.1 beschriebenen Effizienz-korrigierten $\Delta\Delta C_T$ -Methode unter Verwendung der an einen Threshold von 200,00 adaptierten C_T -Werte. Die Reaktionseffizienz E des Zielgens $E_{(Caspase-3)}$ betrug 1,71, die des Referenzgens $E_{(GAPDH)}$ 1,73.

Tabelle 4.17: Ratio R der relativen Genexpression der testikulären Caspase-3 (Casp.-3) [$\bar{x} \pm \text{SD}$; min. - max.]

		$R_{\text{Casp.-3}}$			
		\bar{x}	SD	min.	max.
„Gonazon®“	DG A	1,14 ^A	0,42	0,58	1,61
	DG B	1,18	0,25	0,90	1,36
	DG C	1,03	0,11	0,89	1,16
	DG D	0,88	0,13	0,73	1,08
„Kontrolle adult“		1,02	0,19	0,77	1,25
„Profact®“		1,94 ^B	0,27	1,69	2,23
„juvenil“		1,61 ^{A,B}	0,12	1,50	1,74
DatA I ¹⁾	ANOVA	n. s.			
DatA II ²⁾	ANOVA	$p=0,0367 \rightarrow \text{Tukey-Test: } p \leq 0,05$			

¹⁾ DatA I (Datenanalyse I): Versuchsgruppen „Gonazon®“ und „Kontrolle adult“

²⁾ DatA II (Datenanalyse II): Versuchsgruppen „Gonazon®“ (DG A), „Profact®“, „juvenil“

	signifikant (p -Wert) / nicht signifikant (n.s.);
ANOVA (einfaktorielle Varianzanalyse)	Werte mit ungleichen Minuskeln (DatA I) bzw. ungleichen Majuskeln (DatA II) unter- scheiden sich signifikant
Tukey-Test	

4.4.3.2.1 Versuchsgruppe „Gonazon®“ Wie aus Tabelle 4.17 und Abbildung 4.33 ersichtlich, variierte innerhalb der Versuchsgruppe „Gonazon®“ die mittlere Ratio der Gruppen DG A bis DG D zwischen $0,88 \pm 0,13$ und $1,18 \pm 0,25$ und wies unter Einbeziehung der „Kontrolle adult“ keinen signifikanten Einfluss der Gruppen auf.

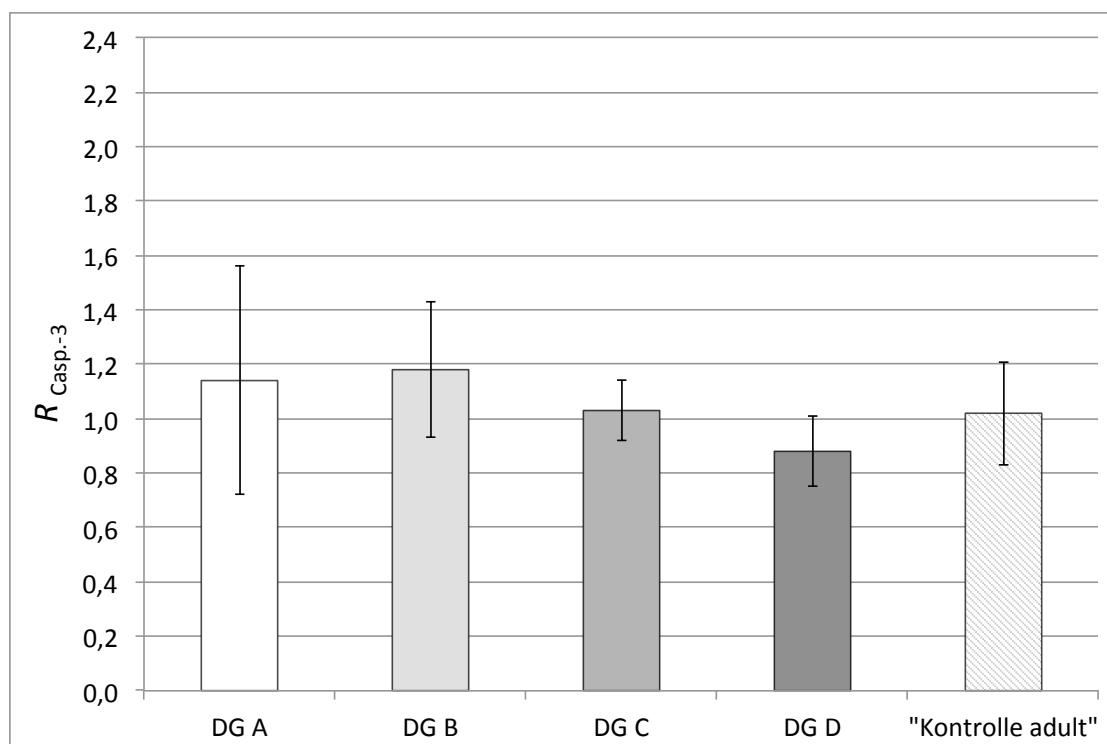


Abbildung 4.33: Ratio R der relativen Gen-Expression der testikulären Caspase-3 (Casp.-3) der Versuchsgruppen „Gonazon[®]“ und „Kontrolle adult“ [$\bar{x} \pm \text{SD}$]

4.4.3.2.2 Versuchsgruppe DG A, „Profact[®]“ und „juvenil“ Die Versuchsgruppe „Profact[®]“ ($1,94 \pm 0,27$) wies gegenüber der Gruppe DG A ($1,14 \pm 0,42$) eine mit $p \leq 0,05$ signifikant erhöhte Ratio R auf (siehe Tabelle 4.17 und Abbildung 4.34). Die R der Versuchsgruppe „juvenil“ betrug $1,61 \pm 0,12$ und unterschied sich nicht von den Gruppen DG A und „Profact[®]“.

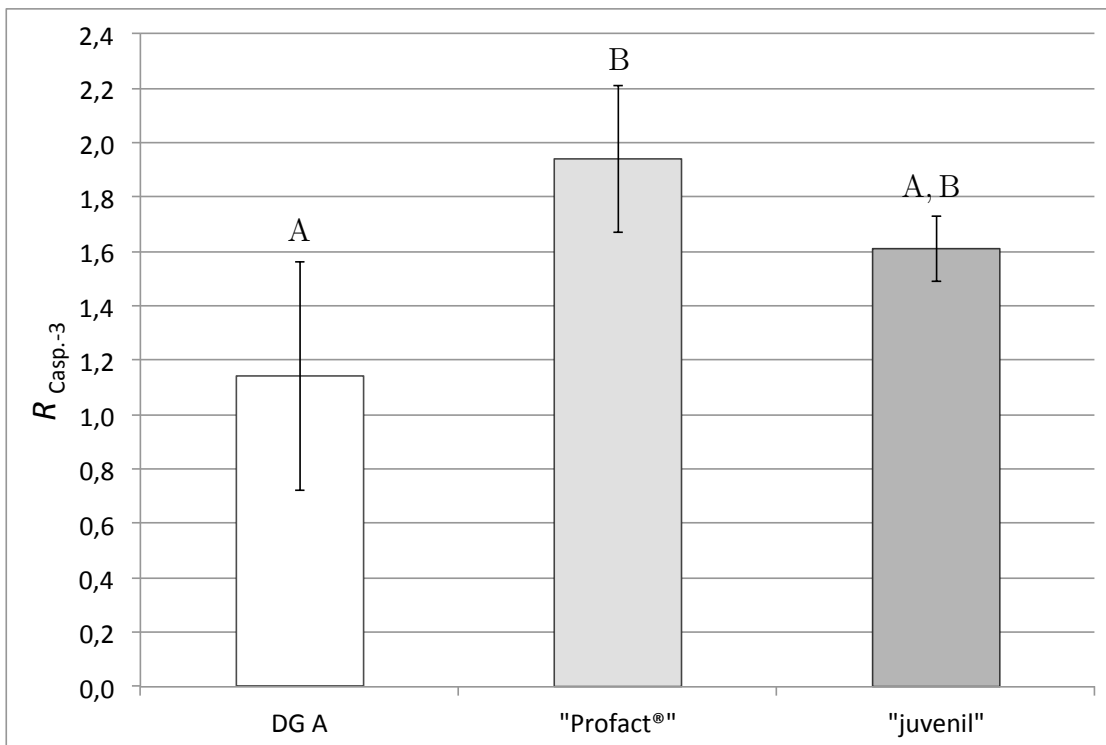


Abbildung 4.34: Ratio R der relativen Gen-Expression der testikulären Caspase-3 (Casp.-3) der Versuchsgruppen „Gonazon[®]“ (DG A), „Profact[®]“ und „juvenil“ [$\bar{x} \pm \text{SD}$; Tukey-Test: $p \leq 0,05$; Werte mit unterschiedlichen Majuskeln unterscheiden sich signifikant]

4.5 Hormone

4.5.1 Testosteron

4.5.1.1 Versuchsgruppe „Gonazon®“

Die Analyse der peripheren Testosteronkonzentrationen schloss den vollständigen Probandenpool der Versuchsgruppe „Gonazon®“ (DG D = 17 Tiere) ein.

Die hormonelle Downregulation der Testosteronsekretion nach Implantation des GnRH-Analogons „Gonazon®“ unterlag einem signifikanten Einfluss des Zeitpunktes (Friedman-Test: $p < 0,0001$). Gegenüber den Ausgangswerten wiesen die mittleren Testosteronkonzentrationen in der 4. und 8. Woche post implantationem des GnRH-Analogons sowie zum Zeitpunkt der Entfernung des Implantates einen hoch signifikanten (Wilcoxon-Test: $p < 0,0001$) Abfall auf (siehe Tabelle 4.18 und Abbildung 4.35). Dabei sanken die individuellen Testosteronwerte letztlich in Bereiche nahe (0,10 ng/ml - 0,30 ng/ml) oder unterhalb ($< 0,10$ ng/ml) der Nachweisgrenze.

Tabelle 4.18: Mittlere periphere Testosteronkonzentration (ng/ml) der Versuchsgruppe „Gonazon®“ [Developmental Group (DG) A - DG D; DG D = 17 Tiere] vor Implantation von „Gonazon®“ (0. Woche) im Vergleich mit den Zeitpunkten 4. und 8. Woche post implantationem (4. / 8. Woche) sowie Implantatentfernung (Woche 0) [$\bar{x} \pm$ SD; min. - max.; * Wilcoxon-Test: $p < 0,0001$]

	\bar{x}	SD	min.	max.		
0. Woche	3,24	1,77	0,59	7,87] *] *] *]
4. Woche	0,16	0,17	0,09	0,81		
8. Woche	0,11	0,08	0,09	0,50		
Woche 0	0,10	0,04	0,09	0,28		

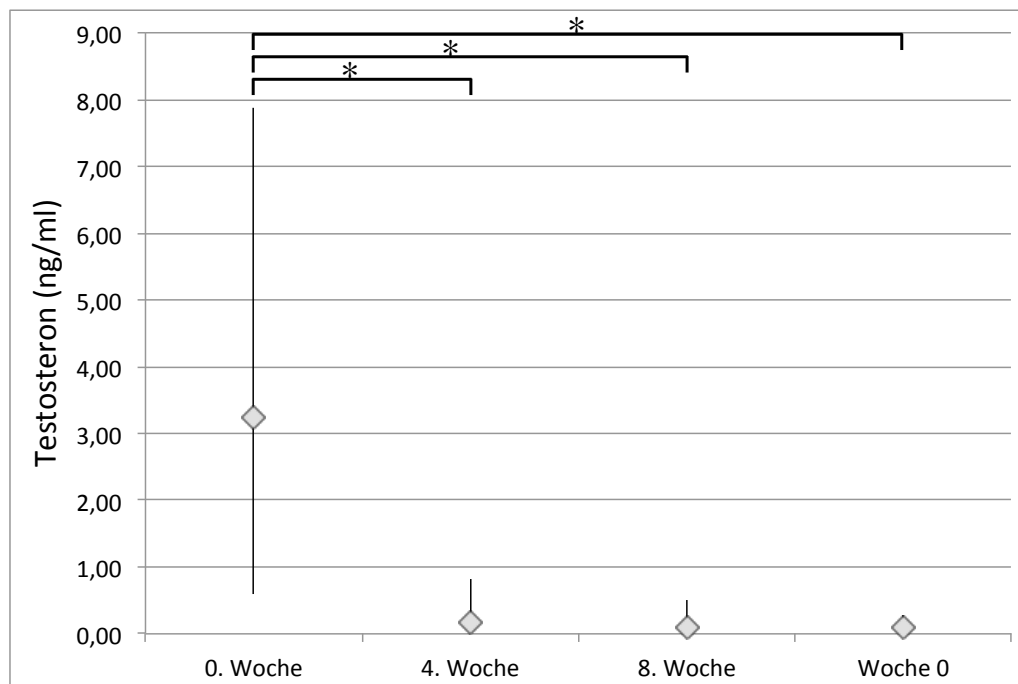


Abbildung 4.35: Mittlere periphere Testosteronkonzentration (ng/ml) der Versuchsgruppe „Gonazon®“ [Developmental Group (DG) A - DG D; DG D = 17 Tiere] vor Implantation von „Gonazon®“ (0. Woche) im Vergleich mit den Zeitpunkten 4. und 8. Woche post implantationem (4. / 8. Woche) sowie Implantatentfernung (Woche 0) [\bar{x} ; min. - max.; *: Wilcoxon-Test: $p < 0,0001$]

Tabelle 4.19 (Seite 183 f.) und Abbildung 4.36 zeigen den Verlauf der nach Entfernung des „Gonazon®“-Implantates wöchentlich gemessenen Testosteronkonzentration gegenüber den bei den entsprechenden Rüden festgestellten Ausgangswerten vor Einpflanzung des „Gonazon®“-Implantat (0. Woche). Aufgrund des Versuchsdesigns mit der Herausnahme von Rüden zum Zeitpunkt der Kastration sowie in Ausnahmefällen fehlenden Messproben ergaben sich zunehmend kleiner werdende Gruppengrößen von maximal 27 Tieren und minimal 2 Tieren.

Mit $p < 0,0001$ (Wald-Test) ergab sich ein signifikanter Einfluss der Woche nach Entnahme des GnRH-Analogons auf die hormonelle Aufregulation. Während in Woche 1, 2, 3, 5 und 6 post explantationem die mittleren Testosteronkonzentrationen mit $p < 0,0001$ bis $p < 0,05$ signifikant niedriger als die entsprechenden Ausgangswerte lagen, waren zu allen späteren Zeitpunkten keine Unterschiede mehr feststellbar (siehe Tabelle 4.19, Seite 183 f.).

Tabelle 4.19: Mittlere periphere Testosteronkonzentration (ng/ml) der jeweiligen Rüden der Versuchsgruppe „Gonazon®“ [Developmental Group (DG) A - DGD; DGD = 17 Tiere] vor Implantation von „Gonazon®“ (Ausgangswert 0. Woche) im Vergleich mit Woche 1 bis Woche 24 post explantationem [$\bar{x}_{geom.}$ (SF); min. - max.]

Probenanzahl	Testosteron (ng/ml)				Probenanzahl	Woche	Testosteron (ng/ml)				p-Wert
	0. Woche (Ausgangswert)						Woche 1-24				
	$\bar{x}_{geom.}$	SF	min.	max.			$\bar{x}_{geom.}$	SF	min.	max.	
24	2,65	2,07	0,6	7,87	24	1	0,27	2,10	0,09	1,29	<0,0001
25	2,71	2,05	0,6	7,87	25	2	0,78	2,83	0,09	2,77	<0,0001
27	2,67	2,01	0,6	7,87	27	3	1,42	3,11	0,12	4,07	0,011
21	2,59	2,10	0,6	5,9	21	4	1,43	2,99	0,09	5,28	0,052
22	2,72	2,14	0,6	7,87	22	5	1,70	2,54	0,20	7,42	0,046
23	2,66	2,13	0,6	7,87	23	6	1,40	3,23	0,12	4,82	0,041
17	2,74	2,30	0,6	7,87	17	7	1,76	2,78	0,17	7,15	0,068
18	2,82	2,26	0,6	7,87	18	8	2,65	2,44	0,48	11,8	0,789
18	2,82	2,26	0,6	7,87	18	9	2,45	2,21	0,39	11,3	0,550
14	2,40	2,29	0,6	5,66	14	10	2,10	2,56	0,30	6,05	0,641
14	2,58	2,30	0,6	5,66	14	11	3,04	1,88	0,59	6,31	0,575
15	2,49	2,25	0,6	5,66	15	12	2,50	1,90	0,73	7,25	0,993

Tabelle 4.19: Fortsetzung (Tabellenbeschriftung siehe Tabelle 4.19, Seite 183)

Testosteron (ng/ml)				Woche		Testosteron (ng/ml)					
Probenanzahl	0. Woche (Ausgangswert)			Probenanzahl	post expl.	Woche 1-24			p-Wert		
	$\bar{x}_{geom.}$	SF	min. max.			$\bar{x}_{geom.}$	SF	min. max.			
10	2,67	2,32	0,6	5,66	10	13	2,44	2,21	0,41	5,11	0,815
11	2,70	2,22	0,6	5,66	11	14	2,44	2,46	0,33	6,56	0,783
12	2,58	2,17	0,6	5,66	12	15	2,80	2,15	0,58	6,22	0,783
8	2,93	2,10	0,8	5,66	8	16	3,27	1,87	1,34	8,35	0,790
8	2,93	2,10	0,8	5,66	8	17	2,21	2,49	0,46	5,65	0,479
8	2,93	2,10	0,8	5,66	8	18	2,04	2,67	0,45	5,07	0,295
6	2,63	1,81	1,1	5,46	6	19	1,75	2,06	0,71	4,20	0,395
5	2,91	1,83	1,1	5,46	5	20	3,02	1,31	2,28	4,41	0,911
5	2,91	1,83	1,1	5,46	5	21	1,93	1,76	0,91	4,41	0,384
2	3,72	1,72	2,5	5,46	2	22	3,77	1,02	3,72	3,82	0,979
2	3,72	1,72	2,5	5,46	2	23	4,16	1,41	3,27	5,29	0,888
3	2,80	1,87	1,6	5,46	3	24	1,31	3,07	0,51	4,54	0,526

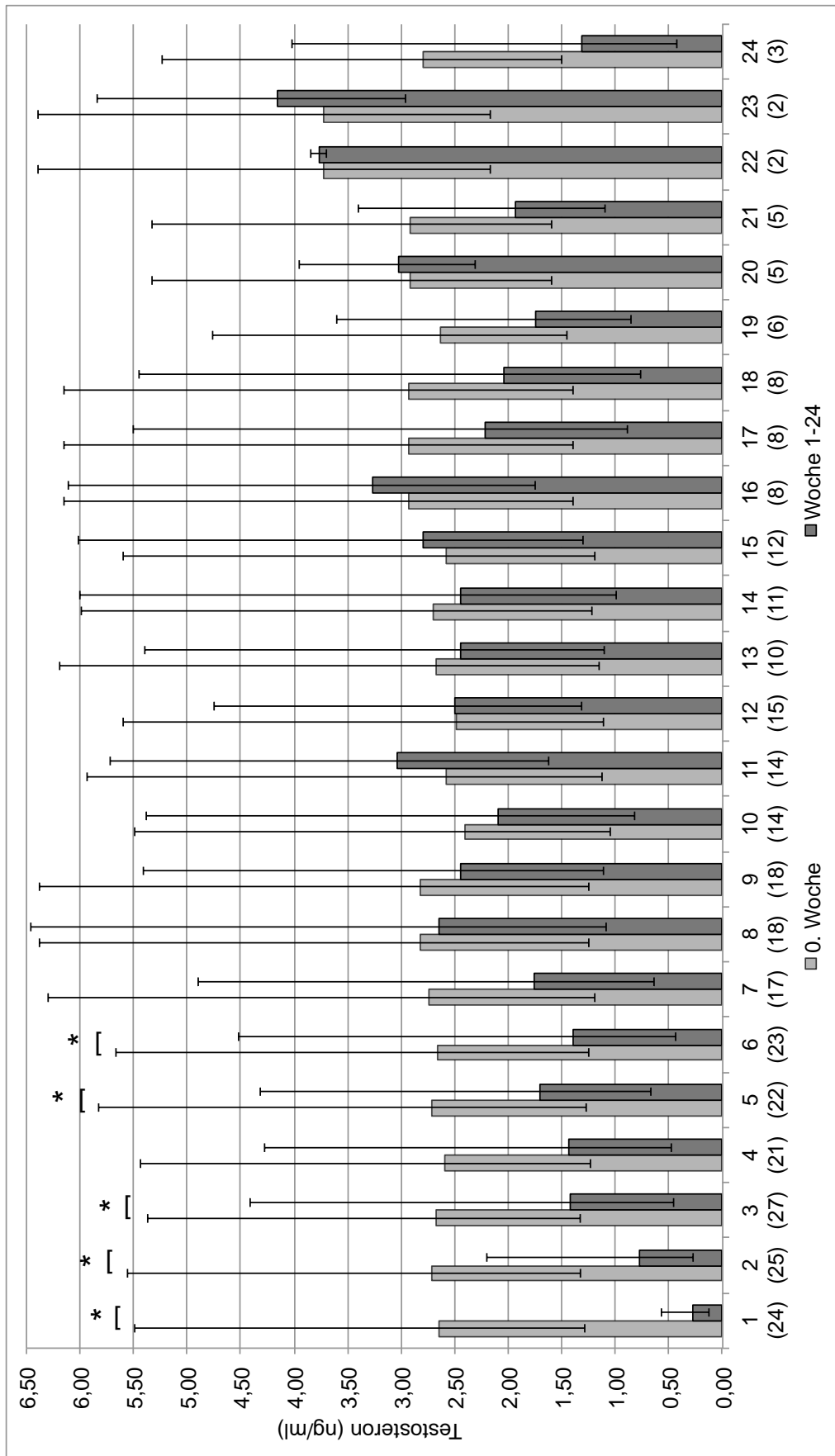


Abbildung 4.36: Mittlere periphere Testosteronkonzentration [$\bar{x}_{geom.}(SF^{\pm 1})$] der jeweiligen Rüden der Versuchsgruppe „Gonazon®“ (Developmental Group (DG) A - DG D; DG D = 17 Tiere) vor Implantation (Ausgangswert 0. Woche) von „Gonazon®“ im Vergleich mit Woche 1 bis Woche 24 post explantationem [1-24: Wochen post explantationem; (27) - (2): Anzahl beprobter Rüden; * Unterschied zwischen 0. Woche und Woche 1-24 mit $p < 0,05$ signifikant]

4.5.1.2 Versuchsgruppe „Profact®“

Alle Rüden der Versuchsgruppe „Profact®“ wiesen in der 8. Woche post implantationem eine unterhalb der Nachweisgrenze befindliche Konzentration an peripherem Testosteron auf. Entsprechende Werte lagen bei den 3 Tieren am Tag der chirurgischen Kastration (Woche 0) vor. Eine den Verlauf der Downregulation beschreibende statistische Auswertung dieser Ergebnisse liegt nicht vor.

4.5.2 LH und FSH

Die für die Versuchsgruppen „Gonazon®“ und „Profact®“ zu verschiedenen Entnahmezeitpunkten ermittelten LH- und FSH-Konzentrationen wurden bereits bei GENTIL (2012) publiziert. Aus Gründen der Vollständigkeit erfolgt ihre Wiedergabe in den Tabellen 4.20 und 4.21.

4.5.2.1 Versuchsgruppe „Gonazon®“

In der Versuchsgruppe „Gonazon®“ ergab sich für LH, ausgehend von einer mittleren Konzentration von 1,56 ng/ml vor Implantation des GnRH-Analogons, ein deutlicher Abfall auf 0,32 ng/ml in der 8. Woche post implantationem bzw. auf 0,19 ng/ml zum Zeitpunkt der Implantatentfernung. Entsprechend erniedrigte sich die mittlere FSH-Konzentration von 4,73 ng/ml auf 0,66 ng/ml bzw. 0,46 ng/ml.

Bezogen auf den Entnahmezeitpunkt des Blutes fanden sich signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen lediglich zum Zeitpunkt der Kastration.

4.5.2.2 Versuchsgruppe „Profact®“

Die Versuchsgruppe „Profact®“ wies zu keinem der beschriebenen Entnahmezeitpunkte einen gegenüber der Versuchsgruppe „Gonazon®“ DG A signifikanten Unterschied in der peripheren LH- und FSH-Konzentration auf.

Tabelle 4.20: LH-Konzentration im Blutplasma in ng/ml zu den verschiedenen Entnahmezeitpunkten, Gruppenmittelwerte [$\bar{x}_{geom.}$ (SF)] (entnommen GENTIL, 2012)

LH-Konzentration in ng/ml [$\bar{x}_{geom.}$ (SF)]				
Gruppe	vor Implantat	nach 8 Wochen	nach 5 Monaten	bei Kastration
PG ¹	3,22 (1,13)	0,17 (2,53)	0,46 (1,66) ²	0,46 (1,66) ^A
DG A	1,54 (2,15)	0,17 (2,20)	0,14 (1,54)	0,20 (2,89) ^{a;A}
DG B	1,56 (1,29)	0,35 (1,90)	0,26 (1,26)	1,11 (1,70) ^{a,b}
DG C	2,19 (1,79)	0,40 (1,32)	0,18 (2,28)	1,34 (2,65) ^{*;b}
DG D	0,94 (4,54)	0,37 (2,26)	0,16 (1,71)	1,00 (1,69) ^{***;a,b}

¹ Versuchsgruppe „Profact®“

² identisch mit Zeitpunkt der Kastration

* n = 5

** n = 4

Werte mit unterschiedlichen Majuskeln unterscheiden sich signifikant

Werte mit unterschiedlichen Minuskeln unterscheiden sich signifikant

Tabelle 4.21: FSH-Konzentration im Blutplasma in ng/ml zu den verschiedenen Entnahmezeitpunkten, Gruppenmittelwerte [$\bar{x}_{geom.}$ (SF)] (entnommen GENTIL, 2012)

FSH-Konzentration in ng/ml [$\bar{x}_{geom.}$ (SF)]				
Gruppe	vor Implantat	nach 8 Wochen	nach 5 Monaten	bei Kastration
PG ¹	6,38 (1,65)	1,29 (4,86)	0,99 (3,58) ²	0,99 (3,58) ^A
DG A	4,77 (1,55)	1,06 (5,02)	0,93 (3,33)	1,56 (1,92) ^{a;A}
DG B	5,16 (1,38)	0,64 (4,07)	0,45 (4,69)	6,37 (1,68) ^b
DG C	4,44 (1,59)	0,34 (2,23)	0,15 (2,34)	5,86 (1,37) ^{*;b}
DG D	4,56 (1,51)	0,59 (3,20)	0,31 (4,09)	3,96 (1,38) ^{***;a,b}

¹ Versuchsgruppe „Profact®“

² identisch mit Zeitpunkt der Kastration

* n = 5

** n = 4

Werte mit unterschiedlichen Majuskeln unterscheiden sich signifikant

Werte mit unterschiedlichen Minuskeln unterscheiden sich signifikant

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, weiterführende Informationen zum Status eines downregulierten Hodens sowie zum Verlauf der Rekrudescenz der endokrinen und germinativen Hodenfunktion beim Hund nach Aufhebung der Downregulation zu erhalten. Im Fokus der Untersuchungen stand dabei die zeitliche Entwicklung der Expression des Androgenrezeptors und dessen Lokalisierung, der Zustand und das Anlaufen der Spermatogenese sowie die Wiederaufnahme der Testosteronproduktion als Indikator für die endokrine Hodenfunktion.

5.1 Versuchsaufbau

Die hormonelle Downregulation der endokrinen und germinativen Hodenfunktion bei Rüden hat, seit ein entsprechendes Tierarzneimittel im Jahr 2007 zugelassen wurde (Suprelorin® ad us. vet., Virbac S. A.), als Routineverfahren zur zeitlich befristeten Kastration Einzug in die tierärztliche Praxis gehalten.

Die Reversibilität der caninen Hodenfunktion nach hormoneller Downregulation mittels GnRH-Agonisten ist bereits vielfach beschrieben (TREMBLAY und BÉLANGER, 1984; VICKERY et al., 1984; DUBÉ et al., 1987; CAVITTE et al., 1988; LACOSTE et al., 1989; INABA et al., 1996; TRIGG et al., 2001; RIESENBECK et al., 2002; LUDWIG et al., 2009).

Im Hinblick auf das in der vorliegenden Studie angewandte GnRH-Analogon „Gonazon®“ zeigten LUDWIG et al. (2009), dass beim Rüden die periphere Testosteronkonzentration sieben Wochen und die Spermaqualität – mit Ausnahme eines oligospermen und eines azoospermen Hundes – etwa 29 bis 30 Wochen nach Aufhebung der Downregulation den

Ausgangswerten entsprochen bzw. diese übertrafen.

Die Terminierung der Kastrationszeitpunkte nach Explantation des GnRH-Analogons „Gonazon®“ basierten demnach sowohl auf den Ergebnissen von LUDWIG et al. (2009) als auch dem Wissen um die Dauer des caninen Spermatogenesezyklus (GÜNZEL-APEL, 1994; SOARES et al., 2009) und der epididymalen Spermienreifung (ALLEN, 1994; GÜNZEL-APEL, 1994).

Die Untersuchung erfolgte an 36 allgemein- und geschlechtsgesunden adulten Beagle-Rüden unterschiedlichen Alters. Fünf Tiere dienten der Kontrolle und wurden einer sofortigen Kastration unterzogen. Mit Ausnahme von 6 Rüden, welche bereits zuvor an der Studie von LUDWIG (2008) mitgewirkt und eine vollständige Reversibilität ihrer Spermatogenese aufgewiesen hatten, erfuhren alle übrigen Hunde eine erstmalige Implantation des GnRH-Analogon „Gonazon®“. Die chirurgische Entfernung des Implantates erfolgte 5 Monate später im Zustand der Downregulation. Beginnend mit dem Tag der Explantation des GnRH-Analogons schlossen sich über einen Zeitraum von 24 Wochen die chirurgischen Kastrationen von jeweils 3 bis 4 Rüden in 3-wöchigem Rhythmus an. Die Zuordnung der Tiere zu den Kastrationszeitpunkten erfolgte nach dem Zufallsprinzip. Bis zu dem Tag ihrer Kastration wurden alle Rüden einer wöchentlichen Blutentnahme zur Beobachtung der hormonellen Aufregulation von Testosteron, FSH und LH unterzogen.

Um einen Vergleich hinsichtlich der downregulierenden Wirkung verschiedener GnRH-Analoga zu ermöglichen, wurden zusätzlich 3 allgemein- und geschlechtsgesunde adulte Beagle-Rüden mit dem den GnRH-Agonisten Buserelinacetat enthaltenden Implantat „Profact® Depot“ behandelt und unter bestehender hormoneller Downregulation kastriert.

Zudem erlaubten die Hoden von 3 juvenilen Hunden unbekannter Rasse eine vergleichende Betrachtung des downregulierten und des juvenilen Hodens.

Alle mit einem GnRH-Analogon behandelten Tiere befanden sich während des Versuchszeitraumes in privater Betreuung (siehe Kapitel 3.1.2, Seite 45). Die Kompliance der Tier-

halter erwies sich als grundsätzlich gut. Von einzelnen Ausnahmen abgesehen konnten zu den vorgegebenen Zeitpunkten Blutproben aller Rüden erhalten werden. Nach erfolgreicher Kastration gingen die Tiere in den Besitz ihrer Halter über.

5.2 Probengewinnung und -konservierung

Die Gewinnung und Konservierung der Blutplasma- und Gewebeproben für die jeweils vorgesehenen Untersuchungen erfolgte nach im hiesigen Labor etablierten Standardverfahren.

5.2.1 Blutproben

Die Blutentnahme zur Bestimmung der peripheren Testosteron-, FSH- und LH-Konzentrationen erfolgte lege artis mittels Punktion der Vena cephalica antebrachii. Die Blutproben wurden in Heparin-beschichteten Blutprobenröhrchen aufgefangen und das durch Zentrifugation gewonnene Plasma bei -20°C bis -23°C tiefgefroren.

Eine Beeinträchtigung der Plasmakonzentration von Testosteron (WICKINGS und NIESCHLAG, 1976) oder FSH und LH (LIVESEY et al., 1980) ist weder durch eine Konservierung bei -20°C bzw. -25°C noch ein mehrmaliges Auftauen nachweisbar. Zudem konnte für Testosteron gezeigt werden, dass eine 3-4-jährige Lagerung von Plasmaproben bei -25°C eine lediglich insignifikante, im Bereich der Genauigkeit der Meßmethode gelegene Abnahme der Steroidhormonkonzentration hervorruft (KLEY et al., 1985).

5.2.2 Gewebeproben

Voraussetzung für sämtliche in dieser Studie durchgeführten Untersuchungen war die sorgfältige und schonende Gewinnung, Aufarbeitung und Konservierung des testikulären Gewebes. Die Entnahme der caninen Hoden erfolgte im Rahmen einer präskrotalen Kastration nach Standardverfahren. Es schlossen sich die sofortige Präparation und Fixation der Hoden an, welche sich nach dem durchzuführenden Untersuchungsverfahren richteten.

Für die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen wurden die testiku-

lären Gewebeproben sowohl in Bouin'scher Lösung als auch Formol nach Lillie fixiert (siehe Kapitel 3.3.1.1). Da die Bouin'sche Lösung, wie auch eigene Voruntersuchungen bestätigten, die testikuläre Gewebestruktur in besonderem Maße erhält und zudem die Antigenität des Gewebes bewahrt (HARLEMAN und NOLTE, 1997), fanden grundsätzlich entsprechend fixierte Gewebe Anwendung. Lediglich die Darstellung apoptotischer Zellen mittels aktivierte Caspase-3-Antikörper und ApopTag® Peroxidase Kit erfolgte an formolfixiertem Gewebe.

Für den Western Blot und die molekularbiologischen Untersuchungen (RT-PCR und RTqPCR) erfolgte die Konservierung von Reiskorn-großen Hodenparenchym-Proben in *RNAlater*® Tissue Collection:RNA Stabilization Solution. Diese unter anderem an testikulärem Gewebe von Tieren erprobte Lösung dient dem Erhalt von Proteinen und schützt die Integrität der RNA (AMBION, INC., 2008). Der Konservierung schloss sich eine Lagerung bei -80 °C an.

5.3 Methodik

5.3.1 Hormonanalyse

Die Bestimmung der Testosteronkonzentration erfolgte mittels eines kompetitiven RIA nach im hiesigen Labor etablierten „Standard Operating Procedures“ (siehe auch bei RÖCKEN et al., 1995 und LUDWIG, 2008). Mit 7,8 % bis 9,0 % lagen die Intra- und Inter-assayvariationskoeffizienten in einem zufriedenstellenden Bereich. Eine Bestätigung der mit diesem Verfahren erhaltenen Werte mittels Gaschromatographie-Massenspektroskopie konnte zwischenzeitlich im Zusammenhang mit anderen Untersuchungen gezeigt werden (apl. Prof. Dr. Gerhard Schuler, Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit tierärztlicher Ambulanz, Giessen; persönliche Mitteilung).

Die Messung der LH-Konzentration wurde wie bei JÄGER (2006) und LUDWIG (2008) beschrieben mittels EIA durchgeführt. Auch hier befanden sich die Variationskoeffizienten mit 9,77 % bis 18,59 % in einem akzeptablen Bereich. Für die Erfassung der FSH-

Konzentration kam ein für den Hund spezifischer, kommerzieller FSH-ELISA zur Anwendung. Die Durchführung des Tests erfolgte entsprechend den Herstellerangaben.

5.3.2 Histologie

Die histologische Untersuchung des Hodengewebes diente der Charakterisierung des Entwicklungszustandes der Spermatogenese. Zur Sicherstellung der Konformität oblag die der Auswertung zugrunde liegende mikroskopische Bewertung ausschließlich einer einzelnen Person (Verfasserin der Dissertation).

Die dazu herangezogenen Schnittpräparationen waren mit Hämatoxylin-Eosin, einer in der Routinediagnostik angewandten und von der vorausgehenden Fixierung unabhängigen Kombinationsfärbung (WACHTLER et al., 2005), vorbehandelt. In einem ersten Schritt wurden pro Rüde mindestens drei verschiedene Hodenschnitte durchmustert, um eine Unterscheidung in Tiere mit unvollständiger und vollständiger Spermatogenese vorzunehmen. Anschließend wurden pro adultem Rüden 200, pro juvenilen Rüden 100 Tubuli seminiferi contorti bei 400-facher Vergrößerung beurteilt. Um die Vergleichbarkeit der Tubuli über alle Gruppen zu ermöglichen, wurden ausschließlich rund angeschnittene, intakte Hodenkanälchen berücksichtigt. Die Klassifizierung der Keimepithelien erfolgte nach beschriebenen Schemata (siehe Kapitel 3.4.1.1), im Lumen befindliche freie Zellen blieben unbeachtet. Während die Tubuli seminiferi contorti von Tieren mit unvollständiger Spermatogenese nach dem am weitesten entwickelten Keimzelltyp eingeteilt wurden, erfolgte die Beurteilung der Tubuli von Hunden mit vollständiger Keimzellentwicklung entsprechend einer Modifikation des von RUSSELL et al. (1990b) beschriebenen caninen Keimepithelzyklus. Die Abwandlung beinhaltete die Zusammenlegung der durch das akrosomale Vesikel gekennzeichneten Stages SII bis SIV, wodurch zwar an Trennschärfe eingebüßt, jedoch an Validität in der Identifikation der Stages gewonnen wurde.

Die Bestimmung des Tubulusdurchmessers erfolgte im Rahmen der Auswertung von immunhistochemisch gegen den AR gefärbten Schnitten. Pro Tier wurden 20 Tubuli seminiferi contorti, welche den vorausgehend beschriebenen Kriterien entsprachen, ausgemessen. Unter Verwendung des Programms Leica Image Manager IM1000 wurde dafür der

rechtwinklig zueinander liegende kleinste und größte Durchmesser eines jeden Tubulus bestimmt (siehe Kapitel 3.6.1.1.2). Der Berechnung des tubulären Flächeninhaltes lag die für eine Ellipse geltende mathematische Formel zugrunde.

5.3.3 Western Blot

Der Western Blot stellt ein wichtiges Instrument zur Sicherung der Spezifität des in der Immunhistochemie verwendeten Antikörpers dar (KURIEN et al., 2011).

Bei dem zu überprüfenden Primärantikörper handelte es sich um den aus dem Kaninchen stammenden polyklonalen Antikörper „AR (N-20):sc-816“ (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), welcher laut Herstellerangaben (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY INC., n. d.) spezifisch den Androgenrezeptor bei Mensch, Ratte und Maus detektiert. Als Proben wurde testikuläres Gesamtprotein vom Hund und von der Referenzspezies Maus herangezogen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in der SDS-PAGE und deren Übertragung auf eine PVDF-Membran im „wet transfer“ (KURIEN und SCOFIELD, 2006) Western Blot. Wie Abbildung 4.8 auf Seite 138 zeigt, konnte beim Hund eine deutlich ausgeprägte und für den AR spezifische Proteinbande von ca. 110 kDa nachgewiesen werden, welche in der Negativkontrolle fehlte und die prädominante Form des AR darstellt. Deutlich schwächer als bei der Maus zeigte sich auch eine Bande bei circa 87 kDa, für die seltene, nicht prädominante Isoform des AR. Zudem fanden sich auch bei 62,5 kDa und 50,0 kDa zwei weitere, jedoch nur schwach ausgeprägte Banden, die ebenfalls in der Negativkontrolle fehlten. Insgesamt läßt dieses Ergebnis auf eine hohe Spezifität der immunhistochemischen Darstellung des AR schließen. Unspezifische, schwache Farbreaktionen können jedoch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, erscheinen allerdings aufgrund einer gegenüber dem Western Blot ($1,0 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{l}$) vielfach niedrigeren Konzentration des Antikörpers in der Immunhistochemie ($2,0 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\mu\text{l}$) als unwahrscheinlich, sodass davon ausgegangen werden kann, dass nur die prädominante Form des AR erfasst wurde.

Eine Überprüfung des „Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen, Clone MIB-1“-Antikörpers (DAKO Denmark A/S) mittels Western Blot war im Rahmen der vorlie-

genden Untersuchung nicht erfolgt, da es sich bei dem angewandten Antikörper gemäß Herstellerangaben (DAKO DENMARK A/S, 2008) um einen „Referenz-Antikörper“ für in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Proben handelt, welcher zudem eine Funktionalität gegenüber Bouin-fixierten Geweben als auch gegenüber der Spezies Hund aufweist.

Aufgrund der vorliegenden positiven Erfahrung in der Anwendung beim Hund (SONNACK, 2009) unterblieb eine weitere Sicherung der Spezifität des vorliegenden monoklonalen Antikörpers „Purified Rabbit Anti-Active Caspase-3 (Clone C92-605)“ (BD Pharmingen) mittels Western Blot. Eine vergleichende Untersuchung hinsichtlich der Methodik (TUNEL versus Immunhistochemie) zur Detektion apoptotischer Zellen in caninem lymphatischem Gewebe schien zudem die Spezifität der intensiven immunhistochemischen Signale und somit des Antikörpers zu bestätigen (siehe Kapitel 4.4.1.1, Seite 172).

5.3.4 Immunhistochemie

5.3.4.1 Immunhistochemische Einfachfärbung

Die Darstellungen der Antigene AR, Ki-67 und aktivierter Caspase-3 erfolgten mittels Einfachfärbung und beruhten auf einem grundsätzlich einheitlichen Vorgehen (Deparaffinierung, Rehydrierung, Hitze-induziertes Antigenretrieval, Blocken der endogenen Peroxidase, Absättigung unspezifischer Bindungen, Inkubation des Erstantikörpers und nachfolgend des biotinylierten Zweitantikörpers, Bindung der signalverstärkenden Peroxidase-konjugierten AB-Komplexe, enzymatische Farbreaktion, Gegenfärbung mit Hämatoxylin und abschließende Konservierung).

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde der methodische und zeitliche Ablauf zur Detektion des AR (siehe Kapitel 3.6.1.1.1, Seite 67) als „immunhistochemisches Standardprotokoll“ definiert. Abweichungen von diesem bei Darstellung des Ki-67- und des Caspase-3-Antigens ergaben sich in Abhängigkeit des Primärantikörpers und dienten der Optimierung des Reaktionsverlaufs.

Die Validierung der Einfachfärbungen erfolgte mittels Positiv- und Negativkontrollen. Während bei der testikulären Detektion des AR bereits die intratubulären Sertolizellen eine interne Positivkontrolle darstellten, kamen bei der Darstellung von Ki-67 und aktivierter Caspase-3 das Darmgewebe bzw. der Lymphknoten eines Hundes als externe Positivkontrollen zur Anwendung. Zudem wurden, zum Ausschluss unspezifischer Bindungen des Zweitantikörpers sowie des ABC-Systems, die immunhistochemischen Antigennachweise von Negativkontrollen begleitet. Die hierzu verwendeten Isotypenkontrollen fanden in einer dem Erstantikörper entsprechenden Konzentration Anwendung. Aufgrund der in einer Vielzahl an Vorversuchen stets ungefärbten Negativkontrollen, erfolgten diese im Rahmen der Detektion von AR und Ki-67 lediglich exemplarisch an je einem Hund pro DG A, DG B, DG C und DG D, „Profact®“ und „juvenil“ sowie der „Kontrolle adult“. Lediglich der Nachweis des aktivierten Caspase-3-Antigens bedurfte einer Negativkontrolle pro Tier, da sich unspezifische Farbniederschläge zeigten, welche sich durch methodische Versuchsanpassungen nicht beheben ließen.

Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitte erfolgte wie in Kapitel 3.6.1.1.2, Seite 70 (AR), Kapitel 3.6.1.2.2, Seite 74 (Ki-67) und Kapitel 3.6.1.3.2, Seite 76 (aktivierte Caspase-3) beschrieben. Es wurden ausschließlich rund angeschittene, intakte Hodenkanälchen bzw. Gesichtsfelder mit mindestens 3 sicher zu identifizierenden Leydigzellen berücksichtigt. Die Realisierung durch eine einzige Person sicherte die Konformität der Auswertungen.

5.3.4.2 Immunhistochemische Doppelfärbung

Der simultane Nachweis von AR und Vimentin erfolgte in Anlehnung an das Standardprotokoll sowie die von LANG (2006) beschriebenen Grundsätze zur Durchführung einer Doppelfärbung. Letztere beinhalteten ein für die darzustellenden Epitope gleichermaßen wirksames Antigen-Retrieval, die zeitlich getrennte Detektion der Antigene mit spezifischen Primärantikörpern unterschiedlicher Herkunftsspezies sowie die Verwendung von unterschiedlichen enzymatischen Detektionssysteme sowie Chromogenen mit einheitlichem Löslichkeitsverhalten ihrer farblichen Endprodukte.

Da es sich bei Vimentin um ein Intermediärfilament sowohl der juvenilen als auch der adulten caninen Sertolizelle handelt (BANCO et al., 2010, GIUDICE et al., 2014), ergab sich für jede Probe eine interne Positivkontrolle. Die Negativkontrollen erfolgten exemplarisch an einem randomisiert ermittelten Rüden pro Versuchsgruppe „Gonazon®“ DG A, „Profact®“ und „juvenil“.

Die Doppelfärbung ließ sich erfolgreich umsetzen (siehe Abbildung 4.10, Seite 140 f.) und diente vorwiegend dem Einfinden in die sichere Identifizierung von Sertolizellen (SZ) sowie Spermatogonien (Spg) und wurde ausschließlich an Gewebeschnitten der Versuchsgruppe „Gonazon®“ DG A, „Profact®“ und „juvenil“ durchgeführt. Grund hierfür war die in frühen spermatogenetischen Entwicklungsphasen erschwerte Differenzierung dieser beiden Zelltypen. Zeitgleich bot sich die Möglichkeit, das in Voruntersuchungen beobachtete Vorkommen immunhistochemisch AR-positiver Spermatogonien zu überprüfen.

5.3.5 TUNEL

Bei dem TUNEL handelt es sich um eine von GAVRIELI et al. (1992) entwickelte Methode zur Detektion von DNA-Strangbrüchen in apoptotischen Zellen. Im Rahmen dieser Studie diente sie der Verifizierung des immunhistochemischen Nachweises von aktivierter Caspase-3.

Zur Anwendung kam das ApopTag® Peroxidase Kit. Anders als bei GAVRIELI et al. (1992) beschrieben, diente hier das pflanzliche Steroid Digoxigenin als Nukleotidmarker. Die Durchführung entsprach grundsätzlich den für paraffiniertes Gewebe vorliegenden Herstellerangaben; Anpassungen betrafen lediglich das an der Größe des Gewebeschnittes orientierte Pipettiervolumen sowie die Zusammensetzung der das NEL vermittelnden „Working Strength TdT-Enzyme“-Lösung.

Die vergleichende Beurteilung der Signalverteilung und -intensität erfolgte an einem als Positivkontrolle fungierenden caninen Lymphknoten.

5.3.6 RT-PCR und RT-qPCR

Zur Absicherung RNA-spezifischer Ergebnisse wurden in Vorbereitung auf die RT-PCR bzw. die RT-qPCR alle verwendeten Proben einer DNase-Behandlung unterzogen. Nach Auffassung von SANYAL et al. (1997) handelt es sich hierbei um die einfachste Art, die in RNA-Präparationen enthaltene kontaminierende genomische DNA zu zerstören. Um eine Schädigung der zukünftigen Transkripte durch die DNase zu vermeiden (HUANG et al., 1996), schloss sich eine Hitze-induzierte Inaktivierung der DNase an. Die Umschreibung der mRNA in cDNA erfolgte in der reversen Transkription mithilfe unspezifischer Startprimer (Random Hexamers). Da es sich hierbei um ein für die sensitive und präzise Quantifizierung der mRNA ausschlaggebendes Verfahren handelt (KUBISTA et al., 2006), erfolgte zum Ausschluss methodischer Unterschiede sowohl die Umschreibung als auch die vorbereitende DNase-Behandlung für alle Proben zeitgleich.

Unter Verwendung von Taq-Polymerasen wurde sowohl die qualitative als auch die quantitative PCR mittels Hot-Start, einer Methode die die Bildung von Primer-Dimern minimiert und die Spezifität der Reaktion erhöht (ERLICH et al., 1991), eingeleitet. Neben den in der PCR verwendeten spezifischen Primern fand in der qPCR zudem eine fluoreszenzmarkierte, sequenzspezifische TaqMan-Hydrolysesonde Anwendung. Es wurde für jede Probe zeitgleich die Expression des Zielgens AR bzw. Caspase-3 sowie eines zur Normalisierung herangezogenen Referenzgens erfasst. Trotz wachsender Kritik (BUSTIN, 2000) diente GAPDH als Referenzgen, da es unabhängig von der Behandlung mit den GnRH-Analoga „Gonazon[®]“ und „Profact[®] Depot“ sowie dem spermatogenetischen Entwicklungszustand der einzelnen Rüden eine konstante Expression zeigte. Das während des gesamten Verfahrens als Negativkontrolle mitgeführte DNase-behandelte DEPC-Wasser diente dem Ausschluss von Kontaminationen.

Der qualitativen PCR schloss sich die Überprüfung der Primerspezifität mittels Sequenzierung durch ein externes Unternehmen an. Zur Auswertung der RT-qPCR-Daten fand die Effizienz-korrigierte relative Quantifizierung nach PFAFFL (2001) Anwendung, da bereits geringe Effizienz-Unterschiede die Gefahr einer Fehleinschätzung der initialen RNA-

Menge bergen (PFAFFL et al., 2002). Die Bestimmung der PCR-Effizienzen erfolgte in einer Verdünnungsreihe anhand des von PFAFFL et al. (2002) empfohlenen und aus allen verwendeten cDNAs bestehenden Probenpools. Zur Normalisierung, welche die Varianz der Expressionsergebnisse reduziert (PFAFFL, 2004b), wurde das endogene Referenzgen GAPDH herangezogen.

5.4 Ergebnisse

5.4.1 GnRH-Analogon „Gonazon®“

5.4.1.1 Erreichung einer hormonellen Downregulation

Voraussetzung für die Untersuchung der Aufregulation der endokrinen und germinativen Hodenfunktion nach hormoneller Downregulation war das tatsächliche Vorliegen einer „chemischen“ Kastration.

Den Eintritt beziehungsweise das Bestehen der endokrinen Downregulation in der 4. und 8. Woche post implantationen (p.i.) sowie bei Entfernung des „Gonazon®“-Implantates zeigte eine gegenüber den Ausgangswerten hochsignifikant abgefallene periphere Testosteronkonzentration (Wilcoxon-Test $p < 0,0001$). Diese wies zum Zeitpunkt der chirurgischen Implantatentnahme (Woche 0) bei einem Großteil der Rüden Werte unterhalb ($< 0,10$ ng/ml), in Einzelfällen auch Werte nahe ($0,12$ ng/ml bis $0,28$ ng/ml) der Nachweisgrenze auf. Auch die der Downregulierung zugrunde liegende hypophysäre Desensibilisierung (FONTAINE und FONTBONNE, 2011) zeigte sich in einer signifikanten Erniedrigung der peripheren Gonadotropinkonzentration in der 8. Woche p.i. des GnRH-Analogons „Gonazon®“ sowie in Woche 0 (GOERICKE-PESCH et al., 2009).

Die Verifizierung der Downregulation der Spermatogenese erfolgte im Rahmen der histologischen Begutachtung von testikulären Gewebeschnitten dreier in Woche 0 kastrierter Rüden. Aufgrund pathologischer Gewebeveränderungen war ein weiterer, ebenfalls zu diesem Zeitpunkt orchidektomierter Hund (Paul) aus dem Versuchstierpool ausgeschlossen worden. Die Tubuli seminiferi contorti der 3 untersuchten Hunde wiesen gegenüber den

Rüden der „Kontrolle adult“ einen bedeutend kleineren Flächeninhalt auf. Das intratubuläre Lumen war weitgehend verschwunden, was als Indiz für eine Schädigung der zellulären Tight Junctions und somit der Blut-Hoden-Schranke (BHS) infolge eines Gonadotropin-Entzuges gewertet werden kann (MCCABE et al., 2010). Entgegen dem bei intakten, reproduktionsfähigen Rüden vorliegenden Keimepithel (vergleiche RUSSELL et al., 1990b), fanden sich lediglich Keimzellen bis einschließlich des Entwicklungsstandes einer Spermatozyte (Spz). Dies entspricht den von DUBÉ et al. (1987) beschriebenen Beobachtungen an mit dem GnRH-Agonisten [D-Trp6]GnRH ethylamide behandelten adulten Hunden. Das Fehlen fortgeschrittener Keimzellen widerspricht dem Ablauf eines vollständigen Spermatogenesezyklus und bestätigt somit das Erreichen einer testikulären Downregulation.

5.4.1.2 Testikuläre Rekrudeszenz

Zur Erfassung der endokrinen Hodenfunktion wurden die ab dem Zeitpunkt der Entfernung des GnRH-Analogons wöchentlich bestimmten, mittleren peripheren Testosteronkonzentrationen mit den Ausgangswerten der entsprechenden Hunde vor Behandlungsbeginn verglichen.

Die endokrine Aufregulation unterlag einem signifikanten Einfluss der Woche post explantationem (Wald-Test $p < 0,0001$). Bereits ab der Woche 7 entsprachen die Testosteronkonzentrationen den ursprünglichen Ausgangswerten, eine Beobachtung, welche auch LUDWIG (2008) und LUDWIG et al. (2009) beschreiben. Eine nachfolgend über den Ausgangswert signifikant erhöhte Testosteronkonzentration, wie ebenfalls von den vorhergenannten Autoren festgestellt, konnte allerdings nicht nachgewiesen werden.

Gegenüber der endokrinen Hodenfunktion wurde eine vollständige Aufregulation der generativen Hodenfunktion deutlich später erreicht und war histologisch sicher erst ab der Woche 12 nachweisbar. Während alle in Woche 0 kastrierten Rüden weitestgehend lumenfreie gewundene Hodenkanälchen mit einem aus Spermatogonien (Spg) bzw. Spg und Spermatozyten (Spz) bestehenden Keimepithel aufwiesen, zeigten die in Woche 3, 6 und 9 kastrierten Tiere starke individuelle Unterschiede in der Keimzellentwicklung. So ent-

sprach beispielsweise die Keimzellentwicklung eines in Woche 3 kastrierten Rüden (Elias) der eines downregulierten Tieres, wohingegen zwei weitere Hunde (Bruno und JoschiF) in Woche 9 bereits eine vollständige Spermatogenese aufwiesen. Die Aufrechterhaltung der Zuordnung nach Kastrationszeitpunkt erschien somit für die Beurteilung der dem Rekrudescenzverlauf zugrunde liegenden Schritte nicht mehr sinnvoll und es erfolgte eine Einteilung der Rüden entsprechend ihres spermatogenetischen Entwicklungsstandes in die Developmental Groups (DG) A bis DG C (unvollständige Spermatogenese) und DG D (vollständige Spermatogenese) (siehe Tabelle 4.1, Seite 123).

Insgesamt wiesen lediglich 13 Rüden eine unvollständige Spermatogenese auf, wobei 4 Tiere der DG A, 3 der DG B und 6 der DG C zugeordnet werden konnten. Für eine detailliertere und individuelle Darstellung der morphologischen Rekrudescenz wurde zudem auf das Vorliegen verschiedener Tubulustypen (tt) untersucht (siehe Tabelle 3.4, Seite 59). Die Klassifizierung nach tt orientierte sich an den sicher identifizierbaren Keimzelltypen. Innerhalb der DG A zeigte sich ein relativ einheitliches Verteilungsbild der tt a (56 % - 70 %) und tt b. Ausnahme hiervon bildete ein Hund (Elias), welcher mit 98,75 % fast ausschließlich tt a besaß. Während sich auch in der DG B die prozentuale Verteilung der tt a bis tt c₁₋₃ annähernd einheitlich gestaltete, ergaben sich insbesondere für die in Woche 6 kastrierten Tiere der Gruppe DG C (Spikey, Snoopy, Strolch, LeoS) starke interindividuelle Unterschiede im Vorkommen der tt a bis tt d₁₋₂. Somit scheint der Zeitraum um die Woche 6 (± 2 Wochen) nach Entfernung des „Gonazon[®]“-Implantates eine besonders dynamische Phase der testikulären Rekrudescenz zu sein, welche eine intensivere weiterführende Untersuchung mit deutlich verkürzten Kastrationsintervallen sinnvoll erscheinen läßt.

Das Vorliegen einer vollständigen Spermatogenese war bei 17 Hunden nachweisbar. Zwei der Tiere befanden sich in Woche 9, alle übrigen in Woche 12 bis 24 post explantationem. Da bei Rüden bereits 10 Wochen nach Entfernung des „Gonazon[®]“-Implantates tote Spermien und 2 weitere Wochen später lebende Spermien im Ejakulat nachgewiesen werden konnten (LUDWIG, 2008), entsprach der in der vorliegenden Studie beobachtete Zeitraum der morphologischen Aufregulation den Erwartungen.

Bei den eine vollständige Spermatogenese aufweisenden Rüden (Versuchsgruppen „Gonazon[®]“ DG D und „Kontrolle adult“) zeigten annähernd alle Hodenkanälchen ein ausge-reiftes Keimepithel. Die individuelle Klassifikation dieser Tubuli seminiferi contorti nach Stages basierte auf einem geringfügig modifizierten Staging nach RUSSELL et al. (1990b) und ermöglichte eine quantitative Erfassung der verschiedenen Stadien des Keimepithel-zyklus. Alle Rüden der DG D sowie der „Kontrolle adult“ wiesen eine annähernd gleiche Verteilung der Stages (S) I bis S VIII auf; starke interindividuelle Unterschiede waren nicht existent. Somit dürfte die Tatsache, dass das von LUDWIG (2008) gewonnene canine Sper-ma erst 24 bis 30 Wochen nach Explantation „Gonazon[®]“-Implantates seine ursprüngliche Ausgangsqualität erreicht hatte, darauf zurückzuführen sein, dass eine Aufkonzentration im Nebenhoden noch nicht erfolgt war.

Die in den eigenen Untersuchungen bei den Rüden der Gruppen DG D und „Kontrolle adult“ beobachtete relative Häufigkeit der einzelnen Stages (siehe Tabelle 5.1) entsprach jedoch lediglich im Hinblick auf S V, S VI und S VII annähernd den von RUSSELL et al. (1990b) beschriebenen Befunden. Die ebenfalls 8 Stages umfassende und grundlegend auf ähnlichen tubulären Klassifikationskriterien basierende Auswertung von FOOTE et al. (1972) erbrachte überwiegend mit RUSSELL et al. (1990b) vergleichbare Ergebnisse (siehe Tabelle 5.1). Die Diskrepanz zwischen den in dieser Untersuchung erhobenen und den von FOOTE et al. (1972) sowie RUSSELL et al. (1990b) beschriebenen Werten mag in metho-dischen Unterschieden, beispielsweise der Tierzahl, der Wahl des Fixans, der Schnittdicke des histologischen Präparates oder der Mikroskopiertechnik, begründet sein; eine subjek-tive Beurteilung durch den Untersucher kann jedoch grundsätzlich nicht ausgeschlossen werden.

Tabelle 5.1: Vergleichende Übersicht über die prozentuale Verteilung der geringgradig modifizierten Stages (S) I- S VIII nach RUSSELL et al. (1990b) bei den Rüden der Versuchsgruppe „Gonazon®“ DG D und der „Kontrolle adult“ sowie den in der Literatur (RUSSELL et al., 1990b, FOOTE et al., 1972) vorliegenden Ergebnisse

„Gonazon®“ DG D ^a (17 Rüden)	„Kontrolle adult“ ^b (5 Rüden)	Stage	Russell et al. (1990b) (1 Rüde)	Foote et al. (1972) (9 Rüden)	Stage
29,26	29,15	I	8,48	8,3	V ¹
23,68	27,85	II-IV	41,98	42,7	VI-VIII ²
18,04	15,35	V	13,51	21,9	I ³
10,43	11,00	VI	14,30	12,7	II ⁴
13,60	11,05	VII	10,73	2,8	III ⁵
3,59	2,65	VIII	10,99	11,5	VI ⁶

^{a,b} 1,40 % ^a bzw. 2,95 % ^b der untersuchten Tubuli seminiferi contorti wiesen ein unvollständig entwickeltes Keimepithel auf, sodass kein Staging nach RUSSELL et al. (1990b) erfolgte;

¹⁻⁶ entspricht grundlegend dem von RUSSELL et al. (1990b) definierten Stage (S): ¹ SI, ² SII-IV, ³ SV, ⁴ S VI, ⁵ S VII und ⁶ S VIII

In hochsignifikantem Zusammenhang mit der Entwicklung des testikulären Keimepithels post explantationem des GnRH-Analogons „Gonazon®“ stand die Zunahme des tubulären Flächeninhaltes. Gemäß WEISSBACH und IBACH (1976) stellen sowohl der Flächeninhalt als auch die zugrunde liegenden Tubulusdurchmesser geeignete Messwerte zur quantitativen histologischen Bewertung der Hodenkanälchen dar. In der vorliegenden Untersuchung entsprach der nach vollständiger Rekrudescenz in Gruppe DG D ermittelte Flächeninhalt eines Tubulusquerschnittes dem Wert der „Kontrolle adult“. Mit im Mittel 29925,95 μm^2 (DG D) beziehungsweise 27616,55 μm^2 („Kontrolle adult“) liegen die Werte zwar niedriger als jene, die sich theoretisch aus den von FOOTE et al. (1972) veröffentlichten Angaben zum caninen Tubulusdurchmesser (206 μm - 228 μm) ableiten lassen (circa 33000 μm^2 - 41000 μm^2), bewegen sich jedoch in einem, aus den von WOODALL und JOHNSTONE (1988) beschriebenen tubulären Durchmessern adulter Rüden (143 μm - 245 μm) errechnen-

ten, hypothetischen Bereich von circa $16000 \mu\text{m}^2$ bis $47000 \mu\text{m}^2$. Die in der vorliegenden Untersuchung vergleichsweise niedrigen mittleren tubulären Flächeninhalte der DG D und der „Kontrolle adult“ mögen sich aus dem methodischen Vorgehen ergeben, bei welchem der geringste und der größte rechtwinklig zueinander liegende Durchmesser pro Tubulus seminiferus contortus vermessen wurde.

Die pro tubulärem Querschnitt erfasste mittlere Gesamtzahl an Sertolizellen (SZ) lag innerhalb der Versuchsgruppe „Gonazon®“ zwischen $14,3 \pm 2,6$ und $16,2 \pm 5,5$ und zeigte, trotz signifikanter Veränderungen der Tubulusfläche, im Vergleich mit der „Kontrolle adult“ keine signifikanten Unterschiede. Diese Beobachtung einer scheinbar unveränderlichen Anzahl maturer SZ ist in Einklang mit der Auffassung von einer, mit Beginn der Pubertät einsetzenden, terminalen Differenzierung („functional maturation“) der Sertolizellpopulation (SHARPE et al., 2003).

Den somatischen SZ entsprechend, wiesen auch die in den DGs der Versuchsgruppe „Gonazon®“ sowie der „Kontrolle adult“ pro tubulärem Querschnitt identifizierten Spermatogonien (Spg) zahlenmäßig keinen signifikanten Unterschied auf. Allerdings verzeichnete die Gesamtzahl an Spg pro Tubulusquerschnitt von DG A nach DG B einen tendenziellen Anstieg, welcher als Hinweis auf das spermatogenetische Anlaufen im Rahmen der Rekruteszenz angesehen werden kann (siehe Tabelle 4.9, Seite 148 und Tabelle 4.14, Seite 167).

Essentiell für das Wiedereinsetzen als auch den Erhalt der Spermatogenese ist das Steroidhormon Testosteron (ZIRKIN, 1998), welches seinen regulatorischen Einfluss auf die Keimzellbildung und -reifung rezeptorvermittelt über die Sertolizelle ausübt (O'SHAUGHNESSY, 2014). Ein Nachweis der Expression dieses Hormonrezeptors war im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen daher unerlässlich.

Die Detektion des AR erfolgte immunhistochemisch unter Zuhilfenahme des Antikörpers AR(N-20):sc-816 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Die Spezifität des für Maus, Ratte und Mensch erprobten polyklonalen Primärantikörpers konnte im Western Blot (siehe Abbildung 4.8, Seite 138) bestätigt werden. Die Positivkontrolle zeigte im testikulären Protein von Maus und Hund eine dominierende Band von circa 110 kDa, welche der Molekülmas-

se des AR entspricht (BRINKMANN et al., 1989a, VAN LAAR et al., 1989). Zudem waren eine der seltenen Isoform des AR (87 kDa; WILSON und MCPHAUL, 1996) entsprechende Bande von ungefähr 86 kDa sowie weitere, möglicherweise aus Proteindegradation (GALLAGHER et al., 2004) resultierende, schwächere Banden zwischen 62,5 kDa und 40 kDa sichtbar. Parallel in der Negativkontrolle erscheinende Banden im Bereich von 130 kDa und 70 kDa demonstrierten unspezifische Bindungen, welche in den immunhistochemischen Untersuchungen nicht auftraten.

Die Expression des AR in den SZ ist bereits in einer Vielzahl verschiedener Spezies [Maus (ZHOU et al., 1996), Ratte (SAR et al., 1990; BREMNER et al., 1994; VORNBERGER et al., 1994; SHAN et al., 1997; ZHU et al., 2000), Ziege (GOYAL et al., 1997), Schwein (RAMESH et al., 2007), Pferd (PEARL et al., 2011), Mensch (RUIZEVELD DE WINTER et al., 1991; NIEDERBERGER et al., 1993)] mittels Immunhistochemie nachgewiesen. Die vorliegende Studie bestätigte das Vorkommen AR-positiver SZ auch für den Hund. Während bei den Rüden der DG A lediglich circa 60 % der pro Tubulusquerschnitt identifizierten SZ den AR aufwiesen, lag der Anteil in den übrigen DGs der Versuchsgruppe „Gonazon®“ sowie in der Versuchsgruppe „Kontrolle adult“ bei annähernd 100 %. Ein paarweise Vergleich der benannten Gruppen zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied.

Diese Beobachtungen werfen Fragen nach der Regulation der Expression des AR auf. BLOK et al. (1992b) beschrieben eine unterschiedliche Regulation der testikulären AR-Genexpression in den peritubulären Myoidzellen und den Sertolizellen der immaturen Ratte. Im Hinblick auf die Sertolizellen zeigten in vitro-Untersuchungen einen die Gentranskription des AR beeinflussenden Effekt von FSH, nicht aber von Androgenen auf (BLOK et al., 1992b). Während ein kurzzeitiger Zusatz von FSH zum Zellkulturmedium eine lediglich kurzfristige Reduktion der AR-mRNA-Expression in den SZ bedingte, zog eine längerfristige Addition dieses Gonadotropins eine Zunahme sowohl der AR-mRNA als auch des entsprechenden AR-Proteins nach sich (BLOK et al., 1992a). Dabei beobachteten BLOK et al. (1992a), dass sich mit zunehmendem Alter der immaturen Ratten die Nettozunahme der AR-mRNA in den untersuchten Sertolizellen verringerte. Die posttranskriptionelle Expression des AR in den Sertolizellen immaturer Ratten unterlag zudem dem Einfluss von Testosteron (BLOK et al., 1989, 1992a). Auch für die adulte Ratte ist

die Bedeutung von Androgenen belegt. So zeigten ZHU et al. (2000) in in vivo-Versuchen, dass – nach mehrwöchigem Testosteron- und LH-Entzug mittels eines LHRH (GnRH)-Antagonisten – die Zufuhr eines synthetischen Androgens eine Aufregulation der in den Sertolizellen, Leydigzellen und peritubulären Myoidzellen abgesunkenen immunhistochemischen AR-Signalintensität auf 93 %, 56 % und 69 % des jeweiligen Ausgangswertes bewirkte. Wie von den Autoren auch diskutiert, muss bei dieser Studie beachtet werden, dass FSH lediglich um circa 50 % abgefallen war, sodass bei der vergleichsweise guten Aufregulation des AR in den Sertolizellen von einer synergistischen Wirkung von Androgen und FSH ausgegangen werden kann. Auch in der hier vorliegenden Untersuchung zeigte sich eine zum Zeitpunkt der Implantatentfernung zwar erniedrigte, aber immer noch gut messbare FHS-Konzentration (siehe Tabelle 4.21, Seite 187), deren Einflussnahme auf die Rekrudescenz nicht abgeschätzt werden kann.

Neben der Anzahl wurde in der vorliegenden Studie auch die Färbeintensität der AR-positiven SZ bestimmt. Es zeigte sich, dass die Intensität der immunhistochemischen AR-Färbung in den caninen SZ von Tubulustyp tt a nach tt d₂ zunahm. In Bezug auf die Tubulusentwicklung ließ sich eine signifikant positive Rangkorrelation erkennen. Dies weist auf eine Aufregulation der AR-Konzentration in einer Zelle hin und läßt darauf schließen, dass damit auch die Ansprechbarkeit auf Androgene steigt. Auf eine stagespezifische Expression des AR in den SZ weisen bereits BREMNER et al. (1994), VORNBERGER et al. (1994) and ZHOU et al. (2002) hin.

Der morphologische Reifegrad der AR-positiven SZ zeigte sich auch in der Lage des Zellkerns. Während in der DG A lediglich circa die Hälfte dieser SZ einen basalständigen Kern besaßen, nahm deren Anteil mit zunehmender testikulärer Aufregulation stetig zu und lag in DG D bei annähernd 100 %. Diese Beobachtung entsprach dem Wissen um eine mögliche lumenwärtige Verlagerung des SZ-Kerns in Abhängigkeit von der saisonalen und sexuellen Aktivität (LIEBICH, 1999a).

Anders als bei SAR et al. (1990), RUIZVELD DE WINTER et al. (1991), BREMNER et al. (1994), VORNBERGER et al. (1994), SHAN et al. (1997), ZHU et al. (2000), ZHOU et al.

(2002) und PEARL et al. (2011) beschrieben, konnte in der vorliegenden Studie, in Übereinstimmung mit KIMURA et al. (1993) und ZHOU et al. (1996), eine Expression des AR auch in den Spg festgestellt werden. Zur sicheren Abgrenzung einer AR-positiven Spg von den SZ erfolgte eine immunhistochemische Doppelfärbung, in welcher sowohl der nukleär gelegene AR als auch das die SZ charakterisierende, zytoplasmatische Vimentin dargestellt wurde. Diese qualitative Untersuchung wurde lediglich an testikulären Gewebeproben durchgeführt, in denen das Keimepithel auf SZ sowie Spg und Spz reduziert war (Versuchsgruppe „Gonazon®“ DG A). Die Doppelfärbung bestätigte eine AR-positive Färbung in den caninen Spg. In weiterführenden Untersuchungen (GOERICKE-PESCH et al., 2013) konnte jedoch mithilfe der In Situ Hybridisierung (ISH) dieses Ergebnis zur Expression des AR in den Spg nicht bestätigt werden. Im Hinblick auf diese Diskrepanz und eine immer noch nicht auszuschließende immunhistochemische Fehlreaktion wäre es sicherlich wünschenswert, ein Zellopicking mit nachfolgender RT-qPCR zur Klärung dieses Sachverhaltes anzuwenden.

Der immunhistochemisch detektierte Anteil AR-positiver Spg lag innerhalb der Versuchsgruppe „Gonazon®“ zwischen 14,3 % und 23,8 %. Obwohl unter Berücksichtigung der Versuchsgruppe „Kontrolle adult“ kein signifikanter Einfluss der Gruppe vorlag, zeigte sich von DG A nach DG D eine tendenzielle Abnahme der immunopositiven Spg. Hingegen war die FI der detektierten AR-Expressionen signifikant positiv korreliert mit der Entwicklung des Tublustypps tt a nach tt d₂. Ob Testosteron dabei einen direkt die Meiose fördernden Effekt oder einen anderweitigen Einfluss auf die Zelle ausübt, bleibt spekulativ. Einen essentiellen Einfluss auf die Aufrechterhaltung der postmeiotischen Spermatogenese schließen TSAI et al. (2006) jedoch mithilfe eines keimzellspezifisches AR-Knockout-Modells aus.

Auch in den caninen Leydigzellen (LZ) verlief die immunhistochemische Detektion des AR erwartungsgemäß positiv. Dies überraschte nicht, da die funktionelle Bedeutung des AR in den LZ sowohl für die Steroidogenese als auch die Spermatogenese mithilfe von Knock-out-Modellen verifiziert worden war (TSAI et al., 2006; XU et al., 2007). Der Anteil der den AR exprimierenden LZ lag in den DGs der Versuchsgruppe „Gonazon®“ bei 42,8 % bis 86,6 %, wobei insbesondere in der spermatogenetisch weitestgehend inaktiven DG A

starke interindividuelle Unterschiede auftraten. Möglicherweise resultieren diese Unterschiede aus einem unterschiedlichen Grad der zellulären Downregulation, vielleicht sind sie aber auch das erste Anzeichen einer beginnenden hormonellen Aufregulation, da der AR-positive LZ-Anteil des in Woche 3 befindlichen Hundes (Elias) den der übrigen Tiere der DG A um mehr als 10 % deutlich übertraf. Obwohl sich von DG A nach DG D eine tendenzielle Zunahme des Anteils der AR-exprimierender LZ zeigte, war unter Einbeziehung der „Kontrolle adult“ ein signifikanter Einfluss der Gruppe nicht nachweisbar. Circa 45 % bis 67 % der AR-positiven LZ wiesen eine schwache immunhistochemische FI auf, wobei deren Anteil in der DG D signifikant höher war als in der DG A. Die positiv detektierten LZ von mittlerer und starker FI wiesen in allen DGs eine annähernd gleiche Verteilung auf. Auch VORNBERGER et al. (1994) beschrieben, dass die Immundektion des AR nur in einem Teil der LZ-Zellpopulation und in unterschiedlicher FI auftrat, und schlossen auf eine unterschiedliche funktionelle Aktivität dieser Zellen. Diese Schlussfolgerung scheint sich im Rahmen der vorliegenden Studie, welche eine mit der zunehmenden AR-Expression einhergehende spermatogenetische Entwicklung zeigt, zu bestätigen.

Die RT-PCR diente dem Nachweis der entsprechenden mRNA-Expression und zeigte, entsprechend den Erwartungen, für jede DG der Versuchsgruppe „Gonazon®“ sowie die „Kontrolle adult“ eine spezifische Bande des Zielgens AR (233 bp) bzw. des Referenzgens GAPDH (228 bp). In der Negativkontrolle war keine mRNA nachweisbar und somit eine Kontamination der Proben mit Nukleinsäure ausgeschlossen. Die Sequenzierung erbrachte eine 99 %ige Übereinstimmung der AR-Amplifikate mit der NCBI Referenzsequenz NM_001003053.1, Accession-Nummer NM_001003053 des *Canis lupus familiaris* (siehe Tabelle 3.13, Seite 85). Das Sequenzierungsergebnis der entsprechenden GAPDH-Amplifikate entsprach den Angaben von GenBank AB038240.1, Accessions-Nummer AB038240 (siehe Tabelle 3.13, Seite 85). Die Spezifität der Amplifikate sicherte qualitativ die testikuläre Expression des AR sowohl bei maturen als auch hormonell downregulierten und rekrudeszenten Rüden.

Die quantitative Expression des AR wurde in der RT-qPCR mithilfe des der Normalisierung dienenden Referenzgens GAPDH ermittelt. Sämtlichen erfassten *CP*-Werten lag ein

Threshold von 200,00 zugrunde. Die Reaktionseffizienzen befanden sich mit $E_{(AR)}$ 1,80 und $E_{(GAPDH)}$ 1,73 in dem von PFAFFL (2004b) unter optimierten Versuchsbedingungen vermuteten Bereich. Da bereits geringgradige Unterschiede zwischen dem Reaktionskoeffizient von Ziel- und Referenzgen die Berechnung der Expressionsratio verfälschen und somit eine Fehleinschätzung der tatsächlich vorliegenden mRNA-Konzentration hervorrufen (PFAFFL, 2004a), erfolgte eine Effizienzkorrektur. Die testikuläre Expression des AR wies keinen signifikanten Unterschied zwischen hormonell downregulierten, rekrudeszenten oder maturen Rüden auf. Dieses Ergebnis entsprach denen der Immunhistochemie, wo die Zahl der den AR-exprimierenden SZ, Spg und LZ keine Unterschiede zwischen den DGs der Versuchsgruppe „Gonazon®“ und der „Kontrolle adult“ zeigte.

Die immunhistochemische Detektion des Ki-67 gelang vorwiegend intratubulär in den Spg, den primären und sekundären Spermatozyten (pSpz/sSpz) sowie den runden Spermatiden (rSpt), vereinzelt aber auch in den interstitiellen LZ.

Das Vorkommen von Ki-67 in den Spg entsprach den Erwartungen, da bereits GERDES et al. (1984) während des mitotischen Zellzyklus die Expression dieses Proteins in der G1-, S-, G2- und M-Phase der kontinuierlich aktiven, nicht aber in der G0-Phase der ruhenden Zelle nachgewiesen hatten. TRAUT et al. (2002) bestätigten ein grundsätzlich vergleichbares Expressionsverhalten von Ki-67 während des meiotischen Zellzyklus. Vor diesem Hintergrund überraschte das Auffinden dieses Proliferationsmarkers in den teilungsinaktiven runden Spermatiden (rSpt). WROBEL et al. (1996) und TRAUT et al. (2002), welche die gleichen Beobachtungen gemacht hatten, begrenzten die Zeit der postmeiotischen Ki-67-Expression auf eine frühe Phase der Spermatiden. Ob diesem Zeitraum die circa 60- bzw. 90-minütige Halbwertszeit des Ki-67 (BRUNO und DARZYNKIEWICZ, 1992; HEIDEBRECHT et al., 1996), die auch in ruhenden Zellen erfolgende Transkription von rRNA (BULLWINKEL et al., 2006) oder eine weitere, unbekannte Ursache zugrunde liegt, kann derzeit nicht gesagt werden.

Aufgrund ihrer funktionellen Bedeutung als Stammzellen der Spermatogenese unterlagen lediglich die Spg einer genauen Untersuchung auf das Vorliegen von Ki-67. Die Expression des Proliferationsmarkers in den Spg eines Tubulusquerschnittes erfolgte uneinheitlich,

wie auch Beobachtungen von WROBEL et al. (1996) belegen. Ursächlich hierfür ist eine lediglich geringgradige Synchronisation dieser Zellen innerhalb eines Tubulussegments (WROBEL et al., 1996). Trotzdem ließ sich eine positive signifikante Rangkorrelation zwischen den die Entwicklung des Keimepithel kennzeichnenden Tubulustypen und den Ki-67 exprimierenden Spg erkennen. Zudem zeigte ein Vergleich der verschiedenen DGs der Versuchsgruppe „Gonazon®“ und der „Kontrolle adult“ einen hochsignifikanten Einfluss der Gruppe. Während in der DG A die Expression des Proliferationsmarkers kaum nachweisbar war, nahm sie im Verlauf der Rekrudescenz von DG A nach DG D schrittweise zu. Es unterschieden sich signifikant die DG A von der DG C, DG D und der „Kontrolle adult“ sowie die DG B von der DG D und der „Kontrolle adult“. Ein Zusammenhang zwischen der Proliferation sowie der testikulären Aufregulation ist feststellbar.

Der Proliferation steht, als Regelmechanismus der zellulären Homöostase, die Apoptose gegenüber (SAID et al., 2004). Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurde der apoptotische Zelltod immunhistochemisch mittels aktivierte Caspase-3 (Casp-3)-Antikörper nachgewiesen. Die Spezifität der detektierten Signale wurde in einem methodischen Vergleich an einem als Positivkontrolle dienendem caninen Lymphknoten bestätigt. Die Gegenüberstellung der Immunhistochemie und des TUNEL zeigte eine annähernd identische Häufung und Lokalisation farbintensiver zellulärer Apoptosesignale, eine Beobachtung, welche auch DUAN et al. (2003) beschreiben. Die in beiden Methoden auftretenden schwachen Farbniederschlägen wurden als unspezifisch gewertet und erfuhren keine Beachtung. Die Negativkontrollen wiesen in keiner der beiden Methoden ein Farbsignal auf.

Anders als im lymphatischen Gewebe erwies sich die immunhistochemische Detektion der aktivierten Casp-3 in den testikulären Gewebeschnitten als problematisch. Trotz einer Vielzahl methodischer Optimierungsversuche zeigten sich in den sowohl mit unspezifischem Kontrollserum als auch mit aktivierte Casp-3-Antikörper behandelten Proben vereinzelt amorphe, hell- bis dunkelbraune Färbrungen. In die Bewertung gingen daher lediglich intensive zelluläre Farbsignale ein. Aufgrund der hohen Unsicherheit beziehungsweise Fraglichkeit der erhobenen Ergebnisse unterblieb eine statistische Auswertung. Deskrip-

tiv war jedoch gegenüber der „Kontrolle adult“ eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen in den DGs der Versuchsgruppe „Gonazon®“ auffindbar. Aufgrund der jedoch geringen absoluten Anzahl apoptotischer Signale wurde im Rahmen der Auswertung keine Unterscheidung der degenerierenden Zellen nach dem spermatogenetischen Typus durchgeführt.

In Ergänzung zur Immunhistochemie erfolgte die Untersuchung zur Casp-3-Expression auf mRNA-Ebene. In der RT-PCR zeigten sich ausschließlich Banden in der erwarteten Größe von Casp-3 (593 bp) und GAPDH (228 bp), wobei letztere als Positivkontrolle die Integrität der mRNA bestätigte. Die Negativkontrolle schloss eine Kontamination der in der RT-PCR verwendeten Lösungen mit Nukleinsäuren aus. Die Sequenzierung der in der RT-PCR gewonnen Casp-3-Amplifikate gelang nur unvollständig. Die mithilfe des forward (for)- und reverse (rev)-Primers sequenzierten Teilstücke wiesen eine 92 %ige bzw. 100 %ige Übereinstimmung mit den Nukleotiden 400 → 530 sowie 629 → 896 der NCBI Referenzsequenz NM_001003042.1, Accession-Nummer NM_001003042 auf. Während der aus 130 Nukleotiden bestehende Sequenzabschnitt lediglich eine hohe Entsprechung mit der vorliegenden Referenzsequenz aufwies, war das 270 Nukleotide große Sequenzierungsergebnis identisch mit der Casp-3 mRNA des *Canis lupus familiaris*.

Die relative Quantifizierung der Casp-3 erfolgte nach PFAFFL (2001) und bediente sich GAPDH als Referenz. Sämtlichen C_T -Werten lag ein Threshold von 200,00 zugrunde. Die Reaktionseffizienz E des Ziel- und Referengens befanden sich mit $E_{(Casp-3)}$ 1,71 und $E_{(GAPDH)}$ 1,73 in dem von PFAFFL (2004b) unter optimierten Versuchsbedingungen vermuteten Bereich. Die Genexpressionen in den DGs der Versuchsgruppe „Gonazon®“ sowie der „Kontrolle adult“ zeigten keinen signifikanten Einfluss der Gruppen. Dieses auf der mRNA-Ebene erhaltene Ergebnis bestätigt demnach nicht die in der IHC (Proteinebene) beobachtete tendenzielle Zunahme apoptotischer Zellsignale im Hoden. Eine Induktion der Apoptose war jedoch vielfach von anderen Autoren sowohl unter experimenteller (TAPANAINEN et al., 1993; TROIANO et al., 1994; MARATHE et al., 1995; BAKALSKA et al., 2004; RUWANPURA et al., 2008) als auch physiologischer (BLOTTNER et al., 1995; MORALES et al., 2002) Suppression der Gonadotropine und/oder des männlichen Sexualhormons Testosteron beschrieben worden. Eine Erklärung hinsichtlich der vorliegenden Diskrepanz

der gemachten Beobachtungen kann derzeit nicht gegeben werden.

5.4.2 GnRH-Analogon „Profact® Depot“

Der in der Humanmedizin eingesetzte GnRH-Agonist „Profact® Depot“ wurde mit dem Ziel eingesetzt, einen Vergleich hinsichtlich des Grades der Downregulation zweier unterschiedlicher GnRH-Agonisten zu erhalten.

Wie bei dem GnRH-Agonisten „Gonazon®“ bewirkte „Profact® Depot“ innerhalb von 8 Wochen eine Downregulation der Sekretion von LH, FSH und Testosteron.

Das unter Downregulation in der Kastration gewonnene Hodengewebe zeigte grundsätzlich die bereits in der DG A der Versuchsgruppe „Gonazon®“ beobachteten histologischen Veränderungen. Die Tubuli seminiferi contorti konnten generell den Tubulustypen tt a und tt b zugeordnet werden, lediglich ein einzelner Tubulusquerschnitt wurde als Typ tt c₁ kategorisiert. Ein zentrales Lumen war in den Hodenkanälchen nicht mehr vorhanden. Der mittlere Flächeninhalt der Tubuli seminiferi contorti betrug 6660,62 µm² und lag damit tendenziell niedriger als in der DG A mit 9881,78 µm² (siehe Tabelle 4.7, Seite 135). Eine Expression des AR in den SZ war lediglich bei einem der drei mit „Profact®“ behandelten Rüden nachweisbar. Dieser besaß mit annähernd 95 % fast ausschließlich immunhistochemisch AR-positive SZ, sodass deren Anzahl mit 5,9 (versus DG A 10,0) pro Tubulusquerschnitt bei der vorliegenden Versuchsgruppe tendenziell geringer war als bei den mit „Gonazon®“ behandelten Tieren der DG A (siehe Tabelle 4.8, Seite 143). Der Anteil der basalständigen AR-positiven SZ pro tubulärem Querschnitt betrug 20 % und war ebenso gegenüber der DG A tendenziell erniedrigt. Ähnlich verhielt es sich mit den AR-exprimierenden Spg, welche lediglich bei zwei der drei Rüden feststellbar waren und deren Zahl mit 0,3 (versus DG A 2,0) pro Tubulusquerschnitt annähernd gegen Null ging. Der Anteil AR-positiver LZ lag bei 23,7 % und teilte sich auf die Färbeintensität (FI) (1), FI 1 und FI 2 mit 14,3 %, 5,0 % und 4,3 % auf. Die Ergebnisse wiesen gegenüber der DG A lediglich eine abnehmende Tendenz, nicht aber eine statistische Signifikanz auf.

In Ergänzung der Immunhistochemie wurde ein Nachweis der testikulären AR-Expression

auf molekularer Ebene durchgeführt. Hierzu schloss sich der erfolgreichen qualitativen RT-PCR eine quantitative RT-qPCR an. Die in letzterer ermittelte Ratio R betrug 0,92 und entsprach damit exakt dem Wert der DG A.

Der Proliferationsmarker Ki-67 war, anders als in der DG A, in den Spg der Versuchsgruppe „Profact®“ niemals detektierbar.

Der Nachweis der testikulären Apoptose erfolgte in einem ersten Schritt immunhistochemisch mittels aktivierter Casp-3. Deskriptiv wurden in der Versuchsgruppe „Profact®“ 5,33 (versus DG A 4,75) apoptotische Zellen pro untersuchter Fläche erfasst. In einem weiteren Schritt sicherte eine spezifische Bande auf Höhe von 593 bp qualitativ die Expression der Casp-3 auf mRNA-Ebene. Die quantitative RT-qPCR zeigte in der Versuchsgruppe „Profact®“ mit einer R von 1,94 eine gegenüber der DG A mit 1,14 signifikant erhöhte Expression der Casp-3 (siehe Tabelle 4.17, Seite 178).

Die Mehrzahl der vorliegenden Untersuchungsergebnisse deutet auf eine – gegenüber der Versuchsgruppe „Gonazon®“ DG A – tendenziell stärkere Ausprägung der testikulären Downregulation nach Applikation des GnRH-Analogons „Profact®“ hin. Dies entspricht dem generellen Eindruck der Untersucherin und ergänzt die bereits von GENTIL (2012) resumierten Erkenntnisse. Aufgrund der geringen Tierzahl sowie den deutlichen, in dieser Versuchsgruppe beobachteten, individuellen Schwankungen ist eine abschließende Beurteilung jedoch nicht möglich. Die Verifizierung potentieller Wirkungsunterschiede bedarf somit eines repräsentativen Probenkollektivs.

5.4.3 Juveniler Hoden

Die Tubuli seminiferi contorti der 2 bis 2,5 Monate alten, juvenilen Hunde wiesen mit im Mittel $3253,15 \mu\text{m}^2$ einen gegenüber den downregulierten Tieren der Versuchsgruppe „Gonazon®“ DG A ($9881,78 \mu\text{m}^2$) und „Profact®“ ($6660,62 \mu\text{m}^2$) geringeren Flächeninhalt auf. Der histologische Aufbau der „kompakt“ erscheinenden Hodenkanälchen ließ ein zentrales Tubuluslumen nicht erkennen. Im Keimepithel fanden sich lediglich unreife SZ sowie die als große und kleine Gonozyten (GZ, gz) bezeichneten Vorläuferzellen der Spg.

Mit im Mittel 25,1 lag die Anzahl an SZ pro Tubulusquerschnitt in der Versuchsgruppe „juvenil“ signifikant höher als in der Versuchsgruppe „Profact®“, eine entsprechende Tendenz zeigte sich für die Versuchsgruppe „Gonazon®“ DG A. Bei den spermatogenetischen Vorläuferzellen, welche unabhängig von ihrer Größe sowohl inmitten des Keimepithels (zentral) als auch auf der Basalmembran (basal) lokalisiert werden konnten, waren mit annähernd 60 % vornehmlich zentral gelegene, große Gonozyten (GZ) anzutreffen. Nach CULTY (2009) durchlaufen die Gonozyten verschiedene Entwicklungsstadien, wobei die ursprünglich große und zentral im lumenfreien Tubulus seminiferus contortus gelegene Gonozyte in Richtung Basalmembran migriert, um schließlich das Erscheinungsbild der Spermatogonie anzunehmen.

Die immunhistochemische Detektion des AR gelang lediglich in den juvenilen LZ. Mit im Mittel 59,3 % lag der Anteil AR-positiver LZ in der Versuchsgruppe „juvenil“ tendenziell höher als in den mittels eines GnRH-Analogons downregulierten Versuchsgruppen „Gonazon®“ DG A (42,8 %) und „Profact®“ (23,7 %). Der Großteil der AR-positiven LZ wies eine schwächere immunhistochemische Färbeintensität (FI) auf, lediglich circa ein Drittel zeigte eine mittlere und nur 5,6 % eine starke Anfärbung. Ein signifikanter Unterschied in der FI der AR-positiven LZ war zwischen den juvenilen und den unter vollständiger hormoneller Downregulation stehenden Tieren nicht nachweisbar.

Die Expression des AR auf mRNA-Ebene zeigte eine spezifische Bande in der erwarteten Höhe von 233 bp sowie in Größe des Referenzgens GAPDH. In der RT-qPCR zeigte sich mit einer mittleren R von 0,31 eine gegenüber den Versuchsgruppen „Gonazon®“ DG A und „Profact®“ (jeweils 0,92) signifikant niedrigere Expression des AR.

In den juvenilen Tubuli seminiferi contorti waren, mit Ausnahme eines einzelnen basalen Gonozyten, keine weiteren immunhistochemischen Proliferationssignale feststellbar. Der immunhistochemische Nachweis aktivierter Casp-3 zeigte mit im Mittel 1,33 Zellen deutlich weniger Apoptosen in der Versuchsgruppe „juvenil“ als in den downregulierten Versuchsgruppen. Die qualitative RT-PCR bestätigte die Expression der Casp-3 auf mRNA-Ebene. Mit einer R von 1,61 wies die in der RT-qPCR ermittelte Expression der apoptotischen Casp-3 keinen signifikanten Unterschied zwischen den juvenilen und den

downregulierten Tieren der Versuchsgruppen „Gonazon[®]“ DG A und „Profact[®]“ auf.

Zusammenfassend zeigt sich, dass der Zustand des juvenilen Hodens nicht mit dem eines hormonell downregulierten Hodens vergleichbar ist.

6 Zusammenfassung

**Rekrudescenz der Spermatogenese beim Hund nach gezielter Aufhebung der Downregulation der germinativen und endokrinen Hodenfunktion:
Untersuchungen unter besonderer Berücksichtigung des Androgenrezeptors**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, weitere Einblicke in die testikuläre Rekrudescenz und deren zeitlichen Verlauf nach gezielter Aufhebung der Downregulation der germinativen und endokrinen Hodenfunktion zu erhalten. Zudem sollten die Untersuchungen vergleichende Informationen hinsichtlich des Grades der downregulierenden Wirkung der slow release-Präparate „Gonazon®“ (enthält den GnRH-Agonisten Azagly-nafarelin, 18,5 mg) und „Profact® Depot“ (enthält den GnRH-Agonisten Buserelinacetat, 6,6 mg) liefern. Ein weiterer Aspekt der Arbeit bestand in der Gegenüberstellung von downreguliertem und juvenilem Hoden.

Versuchsdesign

Die Untersuchungen erfolgten an 38 adulten, geschlechtsgesunden Beagle-Rüden. Im Anschluss an eine erfolgreiche Aufnahmeuntersuchung wurden 5 Tiere chirurgisch kastriert und dienten als Versuchsgruppe „Kontrolle adult“. 30 Hunde wurden zur Herbeiführung der Downregulation mit „Gonazon®“ (Versuchsgruppe „Gonazon®“) und 3 weitere Hunde mit „Profact® Depot“ (Versuchsgruppe „Profact®“) behandelt.

Der Eintritt der Downregulation wurde mittels der Bestimmung von Testosteron (T), LH und FSH im peripheren Plasma kontrolliert. In Woche 0, d. h. 5 Monate nach Behandlungsbeginn, lag eine vollständige Downregulation vor, wie die zu diesem Zeitpunkt nahe oder unterhalb der Nachweisgrenze befindlichen Testosteronkonzentrationen erga-

ben. Auch die Messwerte von LH und FSH wiesen eine deutliche Erniedrigung auf.

In Woche 0 erfolgte die chirurgische Kastration aller Hunde der Versuchsgruppe „Profact®“. Zu selbigem Zeitpunkt wurde sämtlichen Tieren der Versuchsgruppe „Gonazon®“ das GnRH-Implantat entfernt und es erfolgte die chirurgische Kastration der ersten 3 Rüden dieser Gruppe. Von den verbleibenden Rüden wurden bis zur Woche 24 post explantationem (p. expl.) jeweils 3 bis 4 Rüden in 3-wöchigem Intervall kastriert. Im direkten Anschluss an die Kastration wurde das Hodengewebe präpariert und für die weiteren Untersuchungen konserviert. Das Hodengewebe von 3 juvenilen Rüden unbekannter Rasse (Versuchsgruppe „juvenil“) erfuhr eine entsprechende Aufarbeitung.

Datenanalyse

In der statistischen Auswertung wurden zum einen die Versuchsgruppen „Gonazon®“ [Developmental Group (DG) A bis DG D] und „Kontrolle adult“, zum anderen die Versuchsgruppen „Gonazon®“ DG A, „Profact®“ und „juvenil“ berücksichtigt. P -Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant erachtet.

Versuchsgruppe „Gonazon®“

Die hormonelle Aufregulation, gemessen an der peripheren Testosteronkonzentration, erfolgte bei allen Rüden innerhalb von 7 Wochen. Die Rekrudeszenz des Keimepithels wies starke individuelle Unterschiede auf. Daher erfolgte die Gruppierung der Hunde nicht nach den Kastrationszeitpunkten, sondern nach dem am weitest entwickelten Keimzelltypus. Es ergaben sich folgende Entwicklungsgruppen: DG A [Spermatogonien (Spg) bis Spermatozyten (Spz), 4 Hunde], DG B [Spg bis runde Spermatiden (rSpt), 3 Hunde], DG C [Spg bis elongierende Spermatiden (eldSpt), 6 Hunde] und DG D [Spg bis elongierte Spermatiden (eltSpt), 17 Hunde]. Die Gruppen DG A, DG B und DG C setzten sich ausschließlich aus Rüden zusammen, deren chirurgische Kastration innerhalb von 9 Wochen p. expl. erfolgt war und die eine unvollständige Spermatogenese aufwiesen. Alle Rüden der DG D waren frühestens in Woche 9 p. expl. oder zu einem späteren Zeitpunkt kastriert worden und zeigten eine physiologische Spermatogenese.

Die detaillierte Charakterisierung des Keimepithels basierte beim Vorliegen einer unvollständigen Spermatogenese auf der Klassifizierung der tubulären Entwicklung [Tubulustyp (tt) a bis tt d₂], wohingegen im Falle einer vollständigen Spermatogenese ein geringgradig modifiziertes Staging nach RUSSELL et al. (1990b) angewendet wurde. Aufgrund des nahezu einheitlichen Verteilungsmusters der Stages bei den Rüden der DG D, erfolgte in dieser Gruppe im Hinblick auf die umfangreichen, nachfolgend beschriebenen Untersuchungen eine Reduzierung der Tierzahl auf 5 Hunde, welche nach dem Zufallsprinzip ausgewählt wurden.

Die Rekrudescenz des Keimepithels war frühestens in der Woche 9 p. expl. abgeschlossen. Die Querschnittsfläche der Tubuli seminiferi contorti war positiv mit der fortschreitenden Entwicklung der Tubulustypen korreliert. Sie entsprach erstmals in der DG C den Ausgangsmaßen der „Kontrolle adult“, welche tendenziell noch von den Werten der DG D übertroffen wurden. Während – mit Ausnahme des in Woche 3 kastrierten Rüden Elias – bei den Hunden der DG A ein intratubuläres Lumen weitgehend fehlte, zeigte sich dieses wieder in der DG B. Auch die in der DG A tendenziell erniedrigte Anzahl von Spg erreichte in der DG B wieder die Ausgangswerte der „Kontrolle adult“. Die Zahl an Sertolizellen (SZ) schien keiner Veränderung durch die Downregulation unterlegen zu haben.

Die Expression des Androgenrezeptors (AR) im Verlauf der Rekrudescenz wurde sowohl auf Protein- [Western Blot, Immunhistochemie (IHC)] als auch auf mRNA-Ebene (RT-PCR, RT-qPCR) erfasst. Der Nachweis des AR-Proteins gelang in den SZ, Spg, Leydigzellen (LZ) und den peritubulären Myoidzellen. Während die Anzahl AR exprimierender SZ in der DG A nur tendenziell erniedrigt war, ergab sich für die Anzahl AR exprimierender SZ in basaler Position ein signifikanter Effekt der Gruppe, mit dem niedrigsten Wert in DG A. Zudem war die Anzahl der basal gelegenen, den AR-exprimierenden SZ signifikant mit der fortschreitenden Entwicklung des Tubulustyps korreliert. Der relative Anteil der den AR exprimierenden Spg und LZ schwankte innerhalb der DGs von 14,3 % bis 23,8 % bzw. 42 % bis 87 %; ein signifikanter Effekt der Gruppe lag nicht vor. Sowohl in den SZ als auch in den LZ zeigten sich unterschiedliche Färbeintensitäten (FI) in der immunhistochemischen Darstellung des ARs. Die FI der AR-positiven SZ war signifikant positiv

mit der fortschreitenden Entwicklung des Tubulustyps korreliert. Die AR-exprimierenden LZ waren mehrheitlich von schwacher FI [FI (1)]. Die Zahl der die FI (1) aufweisenden LZ war in DG A signifikant niedriger als in DG D. Die Expression des AR auf mRNA-Level unterlag keiner Beeinflussung durch die Downregulation.

Die Erfassung der Proliferation erfolgte durch immunhistochemische Darstellung der Expression von Ki-67. Positive Signale zeigten sich in Spg, primären und sekundären Spz, rSpt und vereinzelt auch in LZ. Aufgrund ihrer grundlegenden Bedeutung für die Spermatogenese wurden jedoch in sämtlichen Auswertungen lediglich die Spg berücksichtigt. Die Downregulation mit „Gonazon®“ bewirkte eine annähernd vollständige Aufhebung der proliferativen Aktivität in den Spg der DG A. Erst in der DG D waren wieder mit der „Kontrolle adult“ vergleichbare Werte nachweisbar. Die Anzahl der proliferierenden Spg war positiv signifikant mit der Entwicklung des Tubulustyps korreliert. Zudem wies die Anzahl an Tubuli seminiferi contorti mit Ki-67-positiven Spg mit fortschreitender tubulärer Entwicklung einen positiv linearen Trend auf.

Das Vorkommen apoptotischer Ereignisse wurde durch Nachweis der Expression der Caspase-3 sowohl auf Protein- (Immunhistochemie) als auch auf mRNA-Ebene (RT-PCR, RT-qPCR) erfasst. Die Spezifität der IHC wurde vor deren Anwendung durch Vergleich mit der TUNEL Methode unter Verwendung von caninem lymphatischen Gewebe verifiziert. Dennoch zeigten sich bei der Anwendung auf caninem Hodengewebe unspezifische Färbungen, sodass ausschließlich eindeutig identifizierbare, kräftige Signale bei der deskriptiven Auswertung berücksichtigt wurden. Obwohl grundsätzlich nur wenige apoptotische Signale auftraten, zeigte sich in allen DGs der Versuchsgruppe „Gonazon®“ eine gegenüber der „Kontrolle adult“ erhöhte Anzahl apoptotischer Ereignisse. Zudem erschienen die in der DG A beobachtete Anzahl apoptotischer Zellen höher als in der DG D. Die RT-qPCR zeigte keinen Effekt der Downregulation.

Versuchsgruppe „Profact®“

Der testikuläre Entwicklungsstand der Rüden der Versuchsgruppe „Profact®“ wies hinsichtlich des morphologischen Erscheinungsbildes, der Expression des ARs sowie des Vor-

kommens proliferativer und apoptotischer Ereignisse keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Versuchsgruppe „Gonazon®“ DG A auf. Subjektiv jedoch schien die Downregulation mit „Profact® Depot“ etwas stärkere Wirkungen hervorzurufen als die Downregulation mit „Gonazon®“.

Versuchsgruppe „juvenil“

Der funktionelle Zustand des Hodengewebes der 2 bis 2,5 Monate alten Hunde unterschied sich deutlich von dem der Versuchsgruppen „Gonazon®“ DG A und „Profact®“. Die tubuläre Querschnittsfläche der juvenilen Tieren war tendenziell kleiner. Das Keim-epithel wies ein obstruiertes Lumen auf und beherbergte große und kleine Gonozyten sowie eine erhöhte Anzahl an SZ. Der AR war immunhistochemisch lediglich in den LZ nachweisbar und wies auf mRNA-Ebene (RT-qPCR) eine gegenüber den Versuchsgruppen „Gonazon®“ DG A und „Profact®“ signifikant niedrigere Expression auf. Die Anzahl der apoptotischen Ereignisse lag deutlich niedriger als in den Versuchsgruppen „Gonazon®“ DG A und „Profact®“, wenngleich kein Unterschied auf mRNA-Ebene zu verzeichnen war.

7 Summary

**Recrudescence of spermatogenesis in dogs following timed abolishment of downregulation of germinal and endocrine testicular function:
Studies with particular focus on the androgene receptor**

Aim of the present study was to gain further insight into the testicular recrudescence and its underlying time course after timed abolishment of germinative and endocrine downregulation of testicular function. Furthermore, the study was designed to obtain comparative information on the degree of downregulation by administration of „Gonazon®“ [slow release implant containing the GnRH-agonist azagly-nafarelin (18.5 mg)] and „Profact® Depot“ [slow release implant containing the GnRH-agonist buserelin acetate (6.6 mg)]. A further aspect was to contrast the downregulated testis with the juvenile testis.

Experimental design

The study included 38 adult male beagle dogs meeting the criteria of breeding soundness. Having successfully passed the entrance examination, 5 dogs were castrated surgically and served as experimental group „control adult“ (CA). 30 dogs were treated with „Gonazon®“ (experimental group „Gonazon®“). In addition, 3 dogs were implanted with „Profact® Depot“ (experimental group „Profact®“).

Downregulation was monitored by determining testosterone (T), LH and FSH in peripheral plasma. In week 0, i.e. 5 months after onset of treatment, full downregulation was obtained as indicated by T-concentration being near or below the level of detection. Also LH and FSH concentration were notably decreased.

At week 0 all dogs of the experimental group „Profact®“ were surgically castrated. At the same time the GnRH implant was removed from all dogs of the „Gonazon®“ group and the first 3 dogs were surgically castrated. Until week 24 post explantation (p. expl.), groups of 3 or 4 of the remaining dogs were surgically castrated in intervals of 3 weeks. Immediately after castration the testicular tissue was prepared and conserved for further investigation. Similarly conserved were the testes of 3 juvenile male dogs of unknown breed aged 2 to 2.5 months (experimental group „juvenile“).

Data analysis

Statistical analysis was conducted on the data from the experimental groups „Gonazon®“ [developmental group (DG) A to DG D] and CA on the one hand, and „Gonazon®“ DG A, „Profact®“ and „juvenile“ on the other hand. P-values $p \leq 0.05$ were considered significant.

Experimental group „Gonazon®“

Hormonal upregulation, as indicated by T-concentration, was completed within 7 weeks in all dogs. Recrudescence of germinal epithelium showed a high individual variability. Hence, the dogs were grouped according to the most developed type of germ cell instead of the time of castration. The following developmental groups arose: DG A [spermatogonia (Spg) and spermatocytes (Spc), 4 dogs], DG B [Spg up to round spermatids (rSpt), 3 dogs], DG C [Spg up to elongating spermatids (eldSpt), 6 dogs] and DG D [Spg up to elongated spermatids (eltSpt), 17 dogs]. The groups DG A, DG B and DG C consisted of dogs that were surgically castrated within 9 weeks after implant removal and showed incomplete spermatogenesis. All dogs of group DG D were castrated earliest at week 9 p. expl. or later and showed a physiological spermatogenesis.

In case of incomplete spermatogenesis the detailed characterization of the germinal epithelium was based upon a classification of the tubular development [type of tubulus (tt) a to tt d₂], whereas in case of a complete spermatogenesis a slightly modified staging according to RUSSELL et al. (1990b) was applied. Due to the virtually identical distribution pattern of stages observed in dogs of DG D, the number of animals used for evaluations described below was reduced to 5 randomly chosen dogs in this group.

Recrudescence of the germinal epithelium was completed earliest at week 9 p.expl. The cross-sectional tubular area was positively correlated with the redevelopment of the type of tubulus. In DG C it equated for the first time to the level of experimental group CA, which by tendency was further exceeded by DG D. Except for the dog that was castrated in week 3 (Elias), the dogs of DG A showed mostly obstructed Tubuli seminiferi contorti. In DG B the tubular lumen had already opened again. Also, the apparently reduced number of spermatogonia in DG A returned to the initial values of CA in DG B. The number of Sertoli cells (SCs) seemed to be unaffected by downregulation.

The expression of the androgen receptor (AR) during the recrudescence was assessed on the protein level [western blot, immunohistochemistry (IHC)] and on the mRNA-level (RT-PCR, RT-qPCR). The AR-protein was detected in SC, Spg, Leydig cell (LC) and peritubular myoid cells. Whereas there was just a slight tendency of less AR-positive SC in DG A, there was a significant effect of group for the number of AR positive SC in basal position with the lowest value in DG A. Furthermore, the number of AR-positive SC in basal position showed a significant positive rank correlation with the progressive development of the type of tubulus. The percentage of Spg and LC staining AR-positive varied within DGs from 14.3 % to 23.8 % and 42 % to 87 %, respectively, with no significant effect of group. SC, as well as LC, had varying staining intensities (SI) of AR in IHC. The SI of AR-positive SC showed significant positive correlation with the progressive development of type of tubulus. By majority, the AR-positive LCs were of weak SI [SI (1)]. The number of weakly stained LCs was significantly lower in DG A when compared to DG D. On the mRNA-level, expression of AR was not affected by downregulation.

Assessment of proliferation was determined by immunohistochemical detection of Ki-67. Positive signals were found in Spg, primary and secondary Spc, rSpt and occasionally also in LC. However, due to their basic importance for spermatogenesis, further evaluation was restricted to Spg. Downregulation with „Gonazon®“ virtually abolished the proliferative activity in Spg of DG A. Comparable values as observed in CA were detected again in DG D. There was a significant positive rank correlation between the number of Ki-67-positive Spg and the progressive development of the type of tubulus. Furthermore, the

number of Tubuli seminiferi contorti holding Ki-67-positive Spg showed a positive trend in tubular development.

Apoptotic events were monitored by testing for the expression of caspase-3 on the protein- (IHC) and mRNA-level (RT-PCR, RT-qPCR). Specificity of IHC was verified prior to its application by comparison with the TUNEL method using canine lymphatic tissue. However, when applied to canine testicular tissue some unspecific staining showed up and consequently only clearly identifiable strong signals were taken into account for a descriptive evaluation. Although there were only few apoptotic signals, all DGs of experimental group „Gonazon®“ clearly showed higher numbers of apoptotic events when compared to CA. Furthermore, the number of apoptotic events seemed to be higher in DG A compared to DG D. The RT-qPCR showed no effect of downregulation.

Experimental group „Profact®“

The status of testicular development in dogs of experimental group „Profact®“ showed no significant differences regarding morphological appearance, expression of AR as well as occurrence of proliferative and apoptotic incidences when compared to DG A. However, subjectively the effects induced by downregulation with „Profact® Depot“ seemed to be somewhat stronger than those induced by „Gonazon®“.

Experimental group „juvenile“

Functional status of the testicular tissue from the 2 to 2.5 month old dogs was distinctly different from that of the experimental groups „Gonazon®“ DG A and „Profact®“. The cross-sectional tubular area in the juvenile animals tended to be smaller. The germinal epithelium showed an obstruction of the lumen and consisted of large and small gonocytes, as well as an increased number of SCs. Immunohistochemically, the AR was only detectable in LCs. Its expression on the mRNA-level (RT-qPCR) was significantly lower than in the experimental groups „Gonazon®“ DG A and „Profact®“. The number of apoptotic events was clearly less when compared to DG A and the „Profact®“ group, although there was no difference on the mRNA-level.

Literaturverzeichnis

- ABBATIELLO E.R., KAMINSKY M. und WEISBROTH S. (1975). The effect of prostaglandins and prostaglandin inhibitors on spermatogenesis. *Int. J. Fertil.* 20 (3): 177–182.
- ABBATIELLO E.R., KAMINSKY M. und WEISBROTH S. (1976). The effect of prostaglandins $F_{1\alpha}$ and $F_{2\alpha}$ on spermatogenesis. *Int. J. Fertil.* 21 (2): 82–88.
- ACEHAN D., JIANG X., MORGAN D.G., HEUSER J.E., WANG X. und AKEY C.W. (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome: Implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol. Cell* 9 (2): 423–432.
- ADHAM I.M., BURKHARDT E., BENAHMED M. und ENGEL W. (1993). Cloning of a cDNA for a novel insulin-like peptide of the testicular Leydig cells. *J. Biol. Chem.* 268 (35): 26668–26672.
- AGOULNIK A.I. (2007). Relaxin and related peptides in male reproduction. *Adv. Exp. Med. Biol.* 612: 49–64.
- ALLEN W.E. (1994). Anatomie der Fortpflanzungsorgane des Rüden. In: Fruchtbarkeit und Geburtshilfe beim Hund, Kapitel 5, 19–21. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 1. übersetzte Auflage.
- ALNEMRI E.S., LIVINGSTON D.J., NICHOLSON D.W., SALVESEN G., THORNBERRY N.A., WONG W.W. und YUAN J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87 (2): 171.
- AMBION, INC. (2008). RNAlater[®] Tissue Collection:RNA Stabilization Solution. Technischer Bericht, Ambion, Inc.

- ANAND-IVELL R., HENG K., HAFEN B., SETCHELL B. und IVELL R. (2009). Dynamics of INSL3 peptide expression in the rodent testis. *Biol. Reprod.* 81 (3): 480–487.
- ANAND-IVELL R.J.K., RELAN V., BALVERS M., COIFFEC-DORVAL I., FRITSCH M., BATHGATE R.A.D. und IVELL R. (2006). Expression of the insulin-like peptide 3 (INSL3) hormone-receptor (LGR8) system in the testis. *Biol. Reprod.* 74 (5): 945–953.
- ANAWALT B.D., BEBB R.A., MATSUMOTO A.M., GROOME N.P., ILLINGWORTH P.J., MCNEILLY A. und BREMNER W.J. (1996). Serum inhibin B levels reflect Sertoli cell function in normal men and men with testicular dysfunction. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81 (9): 3341–3345.
- ARRIGHI S., BOSI G., GROPPETTI D., ARALLA M. und CREMONESI F. (2009). Immunolocalization of INSL3 in dog foetal Leydig cells and the LGR8 receptor in the gubernaculum testis. *Vet. Res. Commun.* 33 (Suppl. 1): S67–S71.
- AU C.L., ROBERTSON D.M. und DE KRETZER D.M. (1986). Measurement of inhibin and an index of inhibin production by rat testes during postnatal development. *Biol. Reprod.* 35 (1): 37–43.
- BAHK J.Y., HYUN J.S., CHUNG S.H., LEE H., KIM M.O., LEE B.H. und CHOI W.S. (1995). Stage specific identification of the expression of GnRH mRNA and localization of the GnRH receptor in mature rat and adult human testis. *J. Urol.* 154 (5): 1958–1961.
- BAILLIE A.H. (1964). The histochemistry and ultrastructure of the gonocyte. *J. Anat.* 98: 641–645.
- BAKALSKA M., ATANASSOVA N., KOEVA Y., NIKOLOV B. und DAVIDOFF M. (2004). Induction of male germ cell apoptosis by testosterone withdrawal after ethane dithanesulfonate treatment in adult rats. *Endocr. Regul.* 38 (3): 103–110.
- BAMBERG E. (1994). Biochemie der gonadalen Steroidhormone. In: F. Döcke (Herausgeber), Veterinärmedizinische Endokrinologie, Kapitel 16.3, 411–418. Gustav Fischer Verlag, Jena, 3., völlig überarbeitete und erweiterte Auflage.

- BANCO B., GIUDICE C., VERONESI M.C., GEROSA E. und GRIECO V. (2010). An immunohistochemical study of normal and neoplastic canine Sertoli cells. *J. Comp. Path.* 143 (4): 239–247.
- BARAKAT B., ITMAN C., MENDIS S. und LOVELAND K. (2012). Activins and inhibins in mammalian testis development: New models, new insights. *Mol. Cell. Endocrinol.* 359 (1-2): 66–77.
- BARDIN W., CHENG C.Y., MUSTO N.A. und GUNSALUS G.L. (1988). The Sertoli cell. In: E. Knobil und J. Neill (Herausgeber), *The Physiology of Reproduction*, Band 1, Kapitel 21, 933–974. Raven Press, Ltd., New York, NY, 1. Auflage.
- BARREIRO M.L., SUOMINEN J.S., GAYTÁN F., PINILLA L., CHOPIN L.K., CASANUEVA F.F., DIÉGUEZ C., AGUILAR E., TOPPARI J. und TENA-SEMPERE M. (2003). Developmental, stage-specific, and hormonally regulated expression of growth hormone secretagogue receptor messenger RNA in rat testis. *Biol. Reprod.* 68 (5): 1631–1640.
- BASCOM K.F. und OSTERUD H.L. (1925). Quantitative studies of the testicle. II. Pattern and total tubule length in the testicles of certain common mammals. *Anat. Rec.* 31: 159–169.
- BATHGATE R.A.D. und SERNIA C. (1994). Characterization and localization of oxytocin receptors in the rat testis. *J. Endocrinol.* 141 (2): 343–352.
- BAUMANS V., DIELEMAN S.J., WOUTERSE H.S., VAN TOL L., DIJKSTRA G. und WENSING C.J.G. (1985). Testosterone secretion during gubernacular development and testicular descent in the dog. *J. Reprod. Fertil.* 73 (1): 21–25.
- BAUMANS V., DIJKSTRA G. und WENSING C.J.G. (1981). Testicular descent in the dog. *Anat. Histol. Embryol.* 10 (2): 97–110.
- BELCHETZ P.E. (1983). Gonadotrophin regulation and clinical applications of GnRH. *Clin Endocrinol Metab* 12 (3): 619–640.
- BHASIN S. und SWERDLOFF R.S. (1984). Testicular GnRH-like factors: Characterization of biologic activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122 (3): 1071–1075.

- BILIŃSKA B., SCHMALZ-FRACZEK B., SADOWSKA J. und CARREAU S. (2000). Localization of cytochrome P450 aromatase and estrogen receptors α and β in testicular cells - An immunohistochemical study of the bank vole. *Acta Histochem.* 102 (2): 167–181.
- BLANCO-RODRÍGUEZ J. (2002a). Deoxyribonucleic acid replication and germ cell apoptosis during spermatogenesis in the rabbit. *J. Androl.* 23 (2): 182–187.
- BLANCO-RODRÍGUEZ J. (2002b). DNA replication and germ cell apoptosis during spermatogenesis in the cat. *J. Androl.* 23 (4): 484–490.
- BLANCO-RODRÍGUEZ J. und MARTÍNEZ-GARCÍA C. (1996). Spontaneous germ cell death in the testis of the adult rat takes the form of apoptosis: re-evaluation of cell types that exhibit the ability to die during spermatogenesis. *Cell Prolif.* 29 (1): 13–31.
- BLANCO-RODRÍGUEZ J. und MARTÍNEZ-GARCÍA C. (1997). Mild hypothermia induces apoptosis in rat testis at specific stages of the seminiferous epithelium. *J. Androl.* 18 (5): 535–539.
- BLANCO-RODRÍGUEZ J. und MARTÍNEZ-GARCÍA C. (1998). Apoptosis pattern elicited by several apoptogenic agents on the seminiferous epithelium of the adult rat testis. *J. Androl.* 19 (4): 535–539.
- BLANCO-RODRÍGUEZ J., MARTÍNEZ-GARCÍA C. und PORRAS A. (2003). Correlation between DNA synthesis in the second, third and fourth generations of spermatogonia and the occurrence of apoptosis in both spermatogonia and spermatocytes. *Reproduction* 126 (5): 661–668.
- BLOK L.J., HOOGERBRUGGE J.W., THEMME A.P.N., BAAREND S W.M., POST M. und GROOTEGOED J.A. (1992a). Transient down-regulation of androgen receptor messenger ribonucleic acid (mRNA) expression in Sertoli cells by follicle-stimulating hormone is followed by up-regulation of androgen receptor mRNA and protein. *Endocrinology* 131 (3): 1343–1349.
- BLOK L.J., MACKENBACH P., TRAPMAN J., THEMME A.P.N., BRINKMANN A.O. und GROOTEGOED J.A. (1989). Follicle-stimulating hormone regulates androgen receptor mRNA in Sertoli cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 63 (1-2): 267–271.

- BLOK L.J., THEMME A.P.N., PETERS A.H.F.M., TRAPMAN J., BAAREND S W.M.,
HOOGERBRUGGE J.W. und GROOTEGOE D J.A. (1992b). Transcriptional regulation
of androgen receptor gene expression in Sertoli cells and other cell types. *Mol. Cell.
Endocrinol.* 88 (1-3): 153–64.
- BLOTTNER S., HINGST O. und MEYER H.H.D. (1995). Inverse relationship between
testicular proliferation and apoptosis in mammalian seasonal breeders. *Theriogenology*
44 (3): 321–328.
- BOATRIGHT K.M. und SALVESEN G.S. (2003). Mechanisms of caspase activation. *Curr.
Opin. Cell Biol.* 15 (6): 725–731.
- BOEPPLE P.A., HAYES F.J., DWYER A.A., RAIVIO T., LEE H., WILLIAM F. CROWLEY
J. und PITTELOUD N. (2008). Relative roles of inhibin B and sex steroids in the nega-
tive feedback regulation of follicle-stimulating hormone in men across the full spectrum
of seminiferous epithelium function. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93 (5): 1809–1814.
- BOGATCHEVA N.V., TRUONG A., FENG S., ENGEL W., ADHAM I.M. und AGOUL-
NIK A.I. (2003). GREAT/LGR8 is the only receptor for insulin-like 3 peptide. *Mol.
Endocrinol.* 17 (12): 2639–2646.
- BONAGURA T.W., ZHOU H., BABISCHKIN J.S., PEPE G.J. und ALBRECHT E.D. (2011).
Expression of P-450 aromatase, estrogen receptor α and β , and α -inhibin in the fetal
baboon testis after estrogen suppression during the second half of gestation. *Endocrine*
39 (1): 75–82.
- BOULANGER P., DESAULNIERS M., DUPUY G.M., BLEAU G., ROBERTS K.D. und
CHAPDELAINE A. (1982). Androgen levels in the liquid of the canine vas deferens and
peripheral plasma. *J. Endocr.* 93 (1): 109–115.
- BOURNE G.A., REGIANI S., PAYNE A.H. und MARSHALL J.C. (1980). Testicular GnRH
receptors – characterization and localization on interstitial tissue. *J. Clin. Endocrinol.
Metab.* 51 (2): 407–409.

- BREMNER W.J., MILLAR M.R., SHARPE R.M. und SAUNDERS P.T.K. (1994). Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: Evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. *Endocrinology* 135 (3): 1227–1234.
- BRENDLER C.B., BERRY S.J., EWING L.L., MCCULLOUGH A.R., COCHRAN R.C., STRANDBERG J.D., ZIRKIN B.R., COFFEY D.S., WHEATON L.G., HILER M.L., BORDY M.J., NISWENDER G.D., SCOTT W.W. und WALSH P.C. (1983). Spontaneous benign prostatic hyperplasia in the beagle. Age-associated changes in serum hormone levels, and the morphology and secretory function of the canine prostate. *J. Clin. Invest.* 71 (5): 1114–1123.
- BRINKMANN A.O., FABER P.W., VAN ROOIJ H.C.J., KUIPER G.G.J.M., RIS C., KLAASSEN P., VAN DER KORPUT J.A.G.M., VOORHORST M.M., VAN LAAR J.H., MULDER E. und TRAPMAN J. (1989a). The human androgen receptor: Domain structure, genomic organization and regulation of expression. *J. Steroid. Biochem.* 34 (1-6): 307–310.
- BRINKMANN A.O., KLAASEN P., KUIPER G.G.J.M., VAN DER KORPUT J.A.G.M., BOLT J., DE BOER W., SMIT A., FABER P.W., VAN ROOIJ H.C.J., VAN KESSEL A.G., VOORHORST M.M., MULDER E. und TRAPMAN J. (1989b). Structure and function of the androgen receptor. *Urol. Res.* 17 (2): 87–93.
- BRINKWORTH M.H., WEINBAUER G.F., SCHLATT S. und NIESCHLAG E. (1995). Identification of male germ cells undergoing apoptosis in adult rats. *J. Reprod. Fertil.* 105 (1): 25–33.
- BRODIE A. und INKSTER S. (1993). Aromatase in the human testis. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 44 (4-6): 549–555.
- BROWN C.J., GOSS S.J., LUBAHN D.B., JOSEPH D.R., WILSON E.M., FRENCH F.S. und WILLARD H.F. (1989). Androgen receptor locus on the human X chromosome: Regional localization to Xq 11-12 and description of a DNA polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* 44 (2): 264–269.

- BROWN D.C. und GATTER K.C. (1990). Monoclonal antibody Ki-67: Its use in histopathology. *Histopathology* 17 (6): 489–503.
- BROWN D.C. und GATTER K.C. (2002). Ki67 protein: The immaculate deception? *Histopathology* 40 (1): 2–11.
- BRUNO S. und DARZYNKIEWICZ Z. (1992). Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif.* 25 (1): 31–40.
- BULLWINKEL J., BARON-LÜHR B., LÜDEMANN A., WOHLLENBERG C., GERDES J. und SCHOLZEN T. (2006). Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J. Cell. Physiol.* 206 (3): 624–635.
- BURGER H.G. (1988). Inhibin: Definition and nomenclature, including related substances. *J. Endocr.* 117 (2): 159–160.
- BUSTIN S.A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25 (2): 169–193.
- BUZZARD J.J., FARNWORTH P.G., DE KRETZER D.M., O’CONNOR A.E., WREFORD N.G. und MORRISON J.R. (2003). Proliferative phase Sertoli cells display a developmentally regulated response to activin in vitro. *Endocrinology* 144 (2): 474–483.
- BÜLLESBACH E.E. und SCHWABE C. (1995). A novel Leydig cell cDNA-derived protein is a relaxin-like factor. *J. Biol. Chem.* 270 (27): 16011–16015.
- CAMBROSIO MANN M., FRIESS A.E. und STOFFEL M.H. (2003). Blood-tissue barriers in the male reproductive tract of the dog: A morphological study using lanthanum nitrate as an electron-opaque tracer. *Cells Tissues Organs (Print)* 174 (4): 162–169.
- CAMERON V.A., NISHIMURA E., MATHEWS L.S., LEWIS K.A., SAWCHENKO P.E. und VALES W.W. (1994). Hybridization histochemical localization of activin receptor subtypes in rat brain, pituitary, ovary, and testis. *Endocrinology* 134 (2): 779–808.

- CARDOSO L.C., NASCIMENTO A.R., ROYER C., PORTO C.S. und LAZARI M.F.M. (2010). Locally produced relaxin may affect testis and vas deferens function in rats. *Reproduction* 139 (1): 185–196.
- CARMEL P.W., ARAKI S. und FERIN M. (1976). Pituitary stalk portal blood collection in rhesus monkeys: Evidence for pulsatile release of gonadotropin-releasing hormone (GnRH). *Endocrinology* 99 (1): 243–248.
- CARPENTER M.P. (1974). Prostaglandins of rat testis. *Lipids* 9 (6): 397–406.
- CARPENTER M.P., ROBINSON R.D. und THUY L.P. (1978). Prostaglandin metabolism by human testis. *Lipids* 13 (4): 308–311.
- CARPINO A., PEZZI V., RAGO V., BILINSKA B. und ANDO S. (2001). Immunolocalization of cytochrome P450 aromatase in rat testis during postnatal development. *Tissue Cell* 33 (4): 349–353.
- CAVITTE J.C., LAHLOU N., MIALOT J.P., MONDAIN-MONVAL M., MIALOT M., NAHOUL K., MOREL C., ROGER M. und SCHALLY A.V. (1988). Reversible effects of long-term treatment with D-Trp6-LH-RH-microcapsules on pituitary-gonadal axis, spermatogenesis and prostate morphology in adolescent and adult dogs. *Andrologia* 20 (3): 249–263.
- CERVENY C., KÖNIG H.E. und LIEBICH H.G. (1999). Männliche Geschlechtsorgane (Organa genitalia masculina). In: H.E. König und H.G. Liebich (Herausgeber), *Anatomie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis, Band II Organe, Kreislauf- und Nervensystem*, 119–134. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1. Auflage.
- CHAN S.Y.W. und TANG L.C.H. (1983). Immunoreactive LHRH-like factor in human seminal plasma. *Arch. Androl.* 10 (1): 29–32.
- CHENG J., WATKINS S.C. und WALKER W.H. (2007). Testosterone activates mitogen-activated protein kinase via src kinase and the epidermal growth factor receptor in Sertoli cells. *Endocrinology* 148 (5): 2066–2074.

- CHINNAIYAN A.M., O'ROURKE K., TEWARI M. und DIXIT V.M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81 (4): 505–512.
- CHOWDHURY I., THARAKAN B. und BHAT G.K. (2008). Caspases - an update. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 151 (1): 10–27.
- CHRISTL H.W. (1990). The lamina propria of vertebrate seminiferous tubules: A comparative light and electron microscopic investigation. *Andrologia* 22 (1): 85–94.
- CLAYTON R.N. (1982). Gonadotropin-releasing hormone modulation of its own pituitary receptors: Evidence for biphasic regulation. *Endocrinology* 111 (1): 152–161.
- CLAYTON R.N., KATIKINENI M., CHAN V., DUFAU M.L. und CATT K.J. (1980). Direct inhibition of testicular function by gonadotropin-releasing hormone: Mediation by specific gonadotropin-releasing hormone receptors in interstitial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77 (8): 4459–4463.
- CLERMONT Y. (1962). Quantitative analysis of spermatogenesis of the rat: A revised model for the renewal of spermatogonia. *Am. J. Anat.* 111 (2): 111–129.
- CLERMONT Y. (1972). Kinetics of spermatogenesis in mammals: Seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol. Rev.* 52 (1): 198–236.
- CLERMONT Y. und PEREY B. (1957). Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *Am. J. Anat.* 100 (2): 241–268.
- COMHAIRE F., MATTHEEUWS D. und VERMEULEN A. (1974). Testosterone and oestradiol in dogs with testicular tumours. *Acta Endocrinol.* 77 (2): 408–416.
- CONNELL C.J. und CHRISTENSEN A.K. (1975). The ultrastructure of the canine testicular interstitial tissue. *Biol. Reprod.* 12 (3): 368–382.
- COOPER D.R. und CARPENTER M.P. (1987). Sertoli-cell prostaglandin synthesis. Effects of (follicle-stimulating hormone) differentiation and dietary vitamin E. *Biochem. J.* 241 (3): 847–855.

- CORRIGAN A.Z., BILEZIKJIAN L.M., CARROLL R.S., BALD L.N., SCHMELZER C.H., FENDLY B.M., MASON A.J., CHIN W.W., SCHWALL R.H. und VALE W. (1991). Evidence for an autocrine role of activin B within rat anterior pituitary cultures. *Endocrinology* 128 (3): 1682–1684.
- CULTY M. (2009). Gonocytes, the forgotten cells of the germ cell lineage. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 87 (1): 1–26.
- DAKO DENMARK A/S (2008). Monoclonal mouse anti-human Ki-67 antigen clone MIB-1 code M7240. Technischer Bericht, Dako Denmark A/S.
- DALKIN A.C., HAISENLEDER D.J., ORTOLANO G.A., ELLIS T.R. und MARSHALL J.C. (1989). The frequency of gonadotropin-releasing-hormone stimulation differentially regulates gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* 125 (2): 917–924.
- DE KRETZER D.M., HEDGER M.P., LOVELAND K.L. und PHILLIPS D.J. (2002). Inhibins, activins and follistatin in reproduction. *Hum. Reprod. Update* 8 (6): 529–541.
- DE KRETZER D.M. und KERR J.B. (1988). The cytology of the testis. In: E. Knobil und J. Neill (Herausgeber), *The Physiology of Reproduction*, Band 1, Kapitel 20, 837–932. Raven Press. Ltd., New York, NY, 1. Auflage.
- DE KRETZER D.M. und ROBERTSON D.M. (1989). The isolation and physiology of inhibin and related proteins. *Biol. Reprod.* 40 (1): 33–47.
- DE ROOIJ D.G. und LOK D. (1987). Regulation of the density of spermatogonia in the seminiferous epithelium of the Chinese hamster: II. Differentiating spermatogonia. *Anat. Rec.* 217 (2): 131–136.
- DE ROOIJ D.G. und RUSSELL L.D. (2000). All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J. Androl.* 21 (6): 776–798.
- DEPALATIS L., MOORE J. und FALVO R.E. (1978). Plasma concentrations of testosterone and LH in the male dog. *J. Reprod. Fertil.* 52 (2): 201–207.

- DUAN W.R., GARNER D.S., WILLIAMS S.D., FUNCKES-SHIPPIY C.L., SPATH I.S. und BLOMME E.A.G. (2003). Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts. *J. Pathol.* 199 (2): 221–228.
- DUBÉ D., ASSAF A., PELLETIER G. und LABRIE F. (1987). Morphological study of the effects of an GnRH agonist on the canine testis after 4 months of treatment and recovery. *Acta Endocrinol.* 116 (3): 413–7.
- DUCHROW M., SCHLÜTER C., WOHLNBERG C., FLAD H.D. und GERDES. J. (1996). Molecular characterization of the gene locus of the human cell proliferation-associated nuclear protein defined by monoclonal antibody Ki-67. *Cell Prolif.* 29 (1): 1–12.
- DUPONT J., MAILLARD V., COYRAL-CASTEL S., RAMÉ C. und FROMENT P. (2010). Ghrelin in female and male reproduction. *Int J Pept* 2010: 158102.
- DYM M. und FAWCETT D.W. (1970). The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol. Reprod.* 3 (3): 308–326.
- DÖCKE F. (1994a). Hypothalamus-Neurohypophysen-System. In: F. Döcke (Herausgeber), Veterinärmedizinische Endokrinologie, Kapitel 7.2, 142–162. Gustav Fischer Verlag, Jena, 3., völlig überarbeitete und erweiterte Auflage.
- DÖCKE F. (1994b). Regelkreise. In: F. Döcke (Herausgeber), Veterinärmedizinische Endokrinologie, Kapitel 5.3.1., 94–96. Gustav Fischer Verlag, Jena, 3., völlig überarbeitete und erweiterte Auflage.
- DÖCKE F. (1994c). Regulation der Keimdrüsenfunktion. In: F. Döcke (Herausgeber), Veterinärmedizinische Endokrinologie, Kapitel 16.6., 446–508. Gustav Fischer Verlag, Jena, 3., völlig überarbeitete und erweiterte Auflage.
- EIK-NES K.B. und KEKRE M. (1963). Metabolism in vivo of steroids by the canine testes. *Biochim. Biophys. Acta* 78 (3): 449–456.
- EINSPANIER A. und IVELL R. (1997). Oxytocin and oxytocin receptor expression in reproductive tissues of the male marmoset monkey. *Biol. Reprod.* 56 (2): 416–422.

- EMA (last updated 05/06/2012). Suprelorin: EPAR Product Information. 25/05/2012
Suprelorin-EMA/V/C/000109-R/0009, EUROPEAN MEDICINES AGENCY,
www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_Product_Information/veterinary/000109/WC500068835.pdf.
- ENARI M., SAKAHIRA H., YOKOYAMA H., OKAWA K., IWAMATSU A. und NAGATA S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391 (6662): 43–50 (ERRATUM in: *Nature* 393 (6683): 396).
- ERLICH H.A., GELFAND D. und SNINSKY J.J. (1991). Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 252 (5013): 1643–1651.
- ESSIG M., SCHOENFELD C., D'ELETTO R., AMELAR R., DUBIN L., STEINETZ B.G., O'BYRNE E.M. und WEISS G. (1982). Relaxin in human seminal plasma. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 380: 224–230.
- EWING L.L., ZIRKIN B.R., COCHRAN R.C., KROMANN N., PETERS C. und RIUZ-BRAVO N. (1979). Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog, and hamster testes perfused in vitro: Correlation with Leydig cell mass. *Endocrinology* 105 (5): 1135–1142.
- FALVO R.E., DEPALATIS L.R., MOORE J., KEPIC T.A. und MILLER J. (1980). Annual variations in plasma levels of testosterone and luteinizing hormone in the laboratory male mongrel dog. *J. Endocr.* 86 (3): 425–430.
- FAN T.J., HAN L.H., CONG R.S. und LIANG J. (2005). Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 37 (11): 719–727.
- FANG Y., FLISS A.E., ROBINS D.M. und CAPLAN A.J. (1996). Hsp90 regulates androgen receptor hormone binding affinity in vivo. *J. Biol. Chem.* 271 (45): 28697–28702.
- FARR C.H. und ELLIS L.C. (1980). In-vitro contractility of rat seminiferous tubules in response to prostaglandins, cyclic GMP, testosterone and 2,4'-dibromoacetophenone. *J. Reprod. Fertil.* 58 (1): 37–42.

- FENG Z.M., MADIGAN M.B. und CHEN C.L.C. (1993). Expression of type II activin receptor genes in the male and female reproductive tissues of the rat. *Endocrinology* 132 (6): 2593–2600.
- FILONZI M., CARDOSO L.C., PIMENTA M.T., QUEIRÓZ D.B.C., AVELLAR M.C.W., PORTO C.S. und LAZARI M.F.M. (2007). Relaxin family peptide receptors Rxfp1 and Rxfp2: Mapping of the mRNA and protein distribution in the reproductive tract of the male rat. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 5: 29.
- FJELLSTRÖM D., KIHLSSTRÖM J.E. und MELIN P. (1968). The effect of synthetic oxytocin upon seminal characteristics and sexual behaviour in male rabbits. *J. Reprod. Fertil.* 17 (1): 207–209.
- FONATSCH C., DUCHROW M., RIEDER H., SCHLÜTER C. und GERDES J. (1991). Assignment of the human Ki-67 gene (MK167) to 10q25-qter. *Genomics* 11 (2): 476–477.
- FONTAINE E. und FONTBONNE A. (2011). Clinical use of GnRH agonists in canine and feline species. *Reprod. Domest. Anim.* 46 (2): 344–353.
- FOOTE R.H., SWIERSTRA E.E. und HUNT W.L. (1972). Spermatogenesis in the dog. *Anat. Rec.* 173 (3): 341–452.
- FORADORI C.D., WEISER M.J. und HANDA R.J. (2008). Non-genomic actions of androgens. *Front Neuroendocrinol* 29 (2): 169–181.
- FORD L. (1969). Testicular maturation in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 30 (3): 331–336.
- FORMAN B.M. und SAMUELS H.H. (1990). Interactions among a subfamily of nuclear hormone receptors: The regulatory zipper model. *Mol. Endocrinol.* 4 (9): 1293–1301.
- FRANCAVILLA S., D’ABRIZIO P., RUCCI N., SILVANO G., PROPERZI G., STRAFACE E., CORDESCHI G., NECOZIONE S., GNESSI L., ARIZZI M. und ULISSE S. (2000). Fas and Fas ligand expression in fetal and adult human testis with normal or deranged spermatogenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85 (8): 2692–2700.

- FRAYNE J. und NICHOLSON H.D. (1998). Localization of oxytocin receptors in the human and macaque monkey male reproductive tracts: Evidence for a physiological role of oxytocin in the male. *Mol. Hum. Reprod.* 4 (6): 527–532.
- FRAYNE J., TOWNSEND D. und NICHOLSON H.D. (1996). Effects of oxytocin on sperm transport in the pubertal rat. *J. Reprod. Fertil.* 107 (2): 299–306.
- FRUNGIERI M.B., GONZALEZ-CALVAR S.I., PARBORELL F., ALBRECHT M., MAYERHOFER A. und CALANDRA R.S. (2006). Cyclooxygenase-2 and prostaglandin F2 α in Syrian hamster Leydig cells: Inhibitory role on luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin-stimulated testosterone production. *Endocrinology* 147 (9): 4476–4485.
- GALLAGHER S., WINSTON S.E., FULLER S.A. und HURRELL J.G. (2004). Immunoblotting and immunodetection. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 10: Unit 10.8.
- GAO W., BOHL C.E. und DALTON J.T. (2005). Chemistry and structural biology of androgen receptor. *Chem. Rev.* 105 (9): 3352–3370.
- GARDE S.V., MOODBIDRI S.B. und SHETH A.R. (1989). Localization of inhibin in testes of human, bonnet monkey, dog and rat by immunoperoxidase technique. *Indian J. Exp. Biol.* 27 (5): 404–407.
- GASSE H. (1999). Männliche Geschlechtsorgane, Organa genitalia masculina. In: J. Frewein, H. Gasse, R. Leiser, H. Roos, H. Thomé, B. Vollmerhaus und H. Waibl (Herausgeber), Lehrbuch der Anatomie der Haustiere (Richard Nickel, August Schummer und Eugen Seiferle), Band II Eingeweide, Kapitel 7, 341–391. Parey Buchverlag im Blackwell Wissenschafts-Verlag GmbH, Berlin, 8., vollständig neubearbeitete Auflage.
- GAVRIELI Y., SHERMAN Y. und BEN-SASSON S.A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119 (3): 493–501.
- GAYTAN F., BARREIRO M.L., CAMINOS J.E., CHOPIN L.K., HERINGTON A.C., MORALES C., PINILLA L., PANIAGUA R., NISTAL M., CASANUEVA F.F., AGUILAR E., DIÉGUEZ C. und TENA-SEMPERE M. (2004). Expression of ghrelin and its functional

- receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in normal human testis and testicular tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89 (1): 400–409.
- GENTIL M. (2012). Wiedereinsetzen der Steroidbiosynthese nach Downregulation der Hodenfunktion beim Rüden: Expression von StAR-Protein, P450scc und P450c17. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet. beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.
- GENTIL M., HOFFMANN B., SPANG A., FAILING K. und GOERICKE-PESCH S. (2012). Restart of steroidogenesis in dogs during recrudescence of testicular function following downregulation with a GnRH-agonist implant. *Cell Tissue Res.* 350 (3): 513–523.
- GERDES J., LEMKE H., BAISCH H., WACKER H.H., SCHWAB U. und STEIN H. (1984). Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J. Immunol.* 133 (4): 1710–1715.
- GERDES J., LI L., SCHLUETER C., DUCHROW M., WOHLBERG C., GERLACH C., STAHRMER I., KLOTH S., BRANDT E. und FLAD H.D. (1991). Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am. J. Pathol.* 138 (4): 867–873.
- GERDES J., SCHWAB U., LEMKE H. und STEIN H. (1983). Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int. J. Cancer* 31 (1): 13–20.
- GILLET C.E. und BARNES D.M. (1998). Demystified... cell cycle. *Mol. Pathol.* 51 (6): 310–316.
- GIUDICE C., BANCO B., VERONESI M.C., FERRARI A., DI NARDO A. und GRIECO V. (2014). Immunohistochemical expression of markers of immaturity in Sertoli and seminal cells in canine testicular atrophy. *J. Comp. Pathol.* 150 (2-3): 208–215.
- GNANAPAVAN S., KOLA B., BUSTIN S.A., MORRIS D.G., MCGEE P., FAIRCLOUGH P., BHATTACHARYA S., CARPENTER R., GROSSMANN A.B. und KORBONITS M. (2002). The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87 (6): 2988–2991.

- GOERICKE-PESCH S., GENTIL M., SPANG A., KOWALEWSKI M.P., FAILING K. und HOFFMANN B. (2013). Status of the down-regulated canine testis using two different GnRH agonist implants in comparison with the juvenile testis. *Reproduction* 146 (6): 517–526.
- GOERICKE-PESCH S., SPANG A., SCHULZ M., ÖZALP G., BERGMANN M., LUDWIG C. und HOFFMANN B. (2009). Recrudescence of spermatogenesis in the dog following downregulation using a slow release GnRH agonist implant. *Reprod. Domest. Anim.* 44 (Suppl. 2): 302–308.
- GORCZYNSKA E. und HANDELSMAN D.J. (1995). Androgens rapidly increase the cytosolic calcium concentration in Sertoli cells. *Endocrinology* 136 (5): 2052–2059.
- GOYAL H.O., BARTOL F.F., WILEY A.A., KHALIL M.K., CHIU J. und VIG M.M. (1997). Immunolocalization of androgen receptor and estrogen receptor in the developing testis and excurrent ducts of goats. *Anat. Rec.* 249 (1): 54–62.
- GRIECO V., BANCO B., FERRARI A., ROTA A., FAUSTINI M. und VERONESI M.C. (2011). Inhibin- α immunohistochemical expression in mature and immature canine Sertoli and Leydig cells. *Reprod. Domest. Anim.* 46 (5): 920–923.
- GRISWOLD M.D. und RUSSELL L.D. (1998). Sertoli cells, function. In: E. Knobil und J.D. Neill (Herausgeber), *Encyclopedia of Reproduction*, Band 4, 371–380. Academic Press, San Diego, CA, 1. Auflage.
- GRÜTTER M.G. (2000). Caspases: Key players in programmed cell death. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10 (6): 649–655.
- GUICCIARDI M.E. und GORES G.J. (2009). Life and death by death receptors. *FASEB J.* 23 (6): 1625–1637.
- GÜNZEL-APEL A.R. (1994). Der Zuchtrüde. In: *Fertilitätskontrolle und Samenübertragung beim Hund*, Kapitel 1, 11–47. Gustav Fischer Verlag, Jena, 1. Auflage.
- GÜNZEL-APEL A.R., BRINCKMANN H.G. und HOPPEN H.O. (1990). Dynamik der

- LH- und Testosteron-Sekretion bei Beagle-Rüden verschiedener Altersgruppen. *Reprod. Domest. Anim.* 25 (2): 78–86.
- GÜNZEL-APEL A.R., HILLEL P. und HOPPEN H.O. (1994). Spontaneous and GnRH-induced pulsatile LH and testosterone release in pubertal, adult and aging male beagles. *Theriogenology* 41 (3): 737–745.
- HADLEY M.A. und DYM M. (1987). Immunocytochemistry of extracellular matrix in the lamina propria of the rat testis: Electron microscopic localization. *Biol. Reprod.* 37 (5): 1283–1289.
- HAISENLEDER D.J., DALKIN A.C., ORTOLANO G.A., MARSHALL J.C. und SHUPNIK M.A. (1991). A pulsatile gonadotropin-releasing hormone stimulus is required to increase transcription of the gonadotropin subunit genes: Evidence for differential regulation of transcription by pulse frequency in vivo. *Endocrinology* 128 (1): 509–517.
- HALÁSZ B. und PUPP L. (1965). Hormone secretion of the anterior pituitary gland after physical interruption of all nervous pathways to the hypophysiotrophic area. *Endocrinology* 77 (3): 553–562.
- HARLEMAN J.H. und NOLTE T. (1997). Testicular toxicity: Regulatory guidelines -the end of formaldehyde fixation? *Toxicol Pathol* 25 (4): 414–417.
- HART B.L. und LADEWIG J. (1979). Serum testosterone of neonatal male and female dogs. *Biol. Reprod.* 21 (2): 289–292.
- HAYES F.J., PITTELOUD N., DECROUZ S., CROWLEY JR. W.F. und BOEPPLE P.A. (2001). Importance of inhibin B in the regulation of FSH secretion in the human male. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 (11): 5541–5546.
- HEIDEBRECHT H.J., BUCK F., HAAS K., WACKER H.H. und PARWARESCH R. (1996). Monoclonal antibodies Ki-S3 and Ki-S5 yield new data on the 'Ki-67' proteins. *Cell Prolif.* 29 (7): 413–425.

- HENINGER N.L., STAUB C., BLANCHARD T.L., JOHNSON L., VARNER D.D. und FORREST D.W. (2004). Germ cell apoptosis in the testes of normal stallions. *Theriogenology* 62 (1-2): 283–297.
- HENRIKSÉN K., KULMALA J., TOPPARI J., MEHROTRA K. und PARVINEN M. (1996). Stage-specific apoptosis in the rat seminiferous epithelium: Quantification of irradiation effects. *J. Androl.* 17 (4): 394–402.
- HESS M.F. und ROSER J.F. (2004). Immunocytochemical localization of cytochrome P450 aromatase in the testis of prepubertal, pubertal, and postpubertal horses. *Theriogenology* 61 (2-3): 293–299.
- HIKIM A.P.S., WANG C., LUE Y., JOHNSON L., WANG X.H. und SWERDLOFF R.S. (1998). Spontaneous germ cell apoptosis in humans: Evidence for ethnic differences in the susceptibility of germ cells to programmed cell death. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83 (1): 152–156.
- HILSCHER W. und HILSCHER B. (1969). Autoradiographische Untersuchungen über die Kinetik der Spermatogenese der Wistarratte unter besonderer Berücksichtigung der Spermatocytogenese. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 96 (4): 625–640.
- HINGST O. und BLOTTNER S. (1995). Quantification of apoptosis (programmed cell death) in mammalian testis by DNA-fragmentation ELISA. *Theriogenology* 44 (3): 313–319.
- HIPLER U.C., HOCHHEIM B., KNÖLL B., TITTELBAACH J. und SCHREIBER G. (2001). Serum inhibin B as a marker for spermatogenesis. *Arch. Androl.* 46 (3): 217–222.
- HOFFMANN B. (1994). Plazentäre Proteo- und Peptidhormone. In: F. Döcke (Herausgeber), Veterinärmedizinische Endokrinologie, Kapitel 17.6, 526–529. Gustav Fischer Verlag, Jena, 3., völlig überarbeitete und erweiterte Auflage.
- HOFFMANN B. (2003). Keimepithel und Spermatogenese. In: Andrologie - Physiologie, Pathologie und Biotechnologie der männlichen Fortpflanzung, Kapitel 5, 28–40. LOB.de - Lehmanns Media, Berlin, 1. Auflage.

- HOLLAND P.M., ABRAMSON R.D., WATSON R. und GELFAND D.H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 (16): 7276–7280.
- HOLSTEIN A.F., SCHULZE W. und DAVIDOFF M. (2003). Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1: 107.
- HOWARD A. und PELC S.R. (1986). Synthesis of desoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Int. J. Radiat. Biol.* 49 (2): 207–218.
- HOWL J., RUDGE S.A., LAVIS R.A., DAVIES A.R.L., PARSLow R.A., HUGHES P.J., KIRK C.J., MICHELL R.H. und WHEATLEY M. (1995). Rat testicular myoid cells express vasopressin receptors: Receptor structure, signal transduction, and developmental regulation. *Endocrinology* 136 (5): 2206–2213.
- HSUEH A.J.W., DAHL K.D., VAUGHAN J., TUCKER E., RIVIER J., BARDIN C.W. und VALE W. (1987). Heterodimers and homodimers of inhibin subunits have different paracrine action in the modulation of luteinizing hormone-stimulated androgen biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84 (14): 5082–5086.
- HUANG Z., FASCO M.J. und KAMINSKY L.S. (1996). Optimization of DNase I removal of contaminating DNA from RNA for use in quantitative RNA-PCR. *BioTechniques* 20 (6): 1012–1014.
- HUCKINS C. (1978). The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: An analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. *Anat. Rec.* 190 (4): 905–926.
- HUHTANIEMI I. und TOPPARI J. (1995). Endocrine, paracrine and autocrine regulation of testicular steroidogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 377: 33–54.
- IBACH B., WEISSBACH L. und HILSCHER B. (1976). Stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the dog. *Andrologia* 8 (4): 297–307.

- ILLINGWORTH P.J., GROOME N.P., BYRD W., RAINEY W.E., MCNEILLY A.S., MATHER J.P. und BREMNER W.J. (1996). Inhibin-B: A likely candidate for the physiologically important form of inhibin in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81 (4): 1321–1325.
- INABA T., UMEHARA T., MORI J., TORII R., TAMADA H. und SAWADA T. (1996). Reversible suppression of pituitary-testicular function by a sustained-release formulation of a GnRH agonist (leuprolide acetate) in dogs. *Theriogenology* 46: 671–677.
- INKSTER S., YUE W. und BRODIE A. (1995). Human testicular aromatase: Immunocytochemical and biochemical studies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80 (6): 1941–1947.
- ISHIKAWA T., FUJIOKA H., ISHIMURA T., TAKENAKA A. und FUJISAWA M. (2007). Ghrelin expression in human testis and serum testosterone level. *J. Androl.* 28 (2): 320–324.
- IVELL R., BALVERS M., DOMAGALSKI R., UNGEFROREN H., HUNT N. und SCHULZE W. (1997). Relaxin-like factor: A highly specific and constitutive new marker for Leydig cells in the human testis. *Mol. Hum. Reprod.* 3 (6): 459–466.
- JACKSON B. und CAPPIELLO V.P. (1964). Ranges of normal organ weights of dogs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 6 (6): 664–668.
- JONES G.E., BAKER K., FAHMY D.R. und BOYNS A.R. (1976). Effect of luteinizing hormone releasing hormone on plasma levels of luteinizing hormone, oestradiol and testosterone in the male dog. *J. Endocrinol.* 68 (3): 469–474.
- JONES G.E. und BOYNS A.R. (1976). Inhibition by oestradiol of the pituitary response to luteinizing hormone releasing hormone in the dog. *J. Endocrinol.* 68 (3): 475–479.
- JÄGER A. (2006). Downregulation von LH bei der Hündin durch Anwendung eines GnRH-Agonisten in Form eines Implantates. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet. beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.

- KAISER U.B., JAKUBOWIAK A., STEINBERGER A. und CHIN W.W. (1997). Differential effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse frequency on gonadotropin subunit and GnRH receptor messenger ribonucleic acid levels in vitro. *Endocrinology* 138 (3): 1224–1231.
- KANG H.Y., TSAI M.Y., CHANG C. und HUANG K.E. (2003). Mechanisms and clinical relevance of androgens and androgen receptor actions. *Chang Gung Med J* 26 (6): 388–402.
- KATO S., SIQIN, MINAGAWA I., AOSHIMA T., SAGATA D., KONISHI H., YOGO K., KAWARASAKI T., SASADA H., TOMOGANE H. und KOHSAKA T. (2010). Evidence for expression of relaxin hormone-receptor system in the boar testis. *J. Endocrinol.* 207 (2): 135–149.
- KATT J.A., DUNCAN J.A., HERBON L., BARKAN A. und MARSHALL J.C. (1985). The frequency of gonadotropin-releasing hormone stimulation determines the number of pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocrinology* 116 (5): 2113–2115.
- KAWAKAMI E., HIRANO T., HORI T. und TSUTSUI T. (2004). Improvement in spermatogenic function after subcutaneous implantation of a capsule containing an aromatase inhibitor in four oligozoospermic dogs and one azoospermic dog with high plasma estradiol-17 β concentrations. *Theriogenology* 62 (1-2): 165–178.
- KAWAKAMI E., HORI T. und TSUTSUI T. (2001). Relationship between testicular transferrin and plasma estradiol-17 β concentrations of dogs with azoospermia and dogs with Sertoli cell tumors. *J. Vet. Med. Sci.* 63 (5): 579–581.
- KAWAKAMI E., KURODA D., HORI T. und TSUTSUI T. (2007). Changes in the plasma testosterone level and testicular superoxide dismutase activity of 5 azoospermic beagles after GnRH analogue injections. *J. Vet. Med. Sci.* 69 (5): 561–562.
- KAWAMURA K., KUMAGAI J., SUDO S., CHUN S.Y., PISARSKA M., MORITA H., TOPPARI J., FU P., WADE J.D., BATHGATE R.A.D. und HSUEH A.J.W. (2004). Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (19): 7323–7328.

- KELCH R.P., JENNER M.R., WEINSTEIN R., KAPLAN S.L. und GRUMBACH M.M. (1972). Estradiol and testosterone secretion by human, simian, and canine testes, in males with hypogonadism and in male pseudohermaphrodites with the feminizing testes syndrome. *J. Clin. Invest.* 51 (4): 824–830.
- KENAGY G.J. und TROMBULAK S.C. (1986). Size and function of mammalian testes in relation to body size. *J. Mammal.* 67 (1): 1–22.
- KERR J.B., LOVELAND K.L., O'BRYAN M.K. und DE KRETZER O.M. (2006). Cytology of the testis and intrinsic control mechanisms. In: J.D. Neill, T.M. Plant, D.W. Pfaff, J.R.G. Challis, D.M. de Kretzer, J.S. Richards und P.M. Wassarman (Herausgeber), Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, Band 1, Kapitel 18, 827 – 947. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, 3. Auflage.
- KERR J.F.R. (1965). A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *J. Pathol. Bacteriol.* 90 (2): 419–435.
- KERR J.F.R. (1971). Shrinkage necrosis: A distinct mode of cellular death. *J. Pathol.* 105 (1): 13–20.
- KERR J.F.R., WYLLIE A.H. und CURRIE A.R. (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26 (4): 239–257.
- KIMURA N., MIZOKAMI A., OONUMA T., SASANO H. und NAGURA H. (1993). Immunocytochemical localization of androgen receptor with polyclonal antibody in paraffin-embedded human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 41 (5): 671–678.
- KLEY H.K., SCHLAGHECKE R. und KRÜSKEMPER H.L. (1985). Stabilität von Steroiden im Plasma über einen Zeitraum von 10 Jahren. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 23 (12): 875–878.
- KLIESCH S., PENTTILÄ T.L., GROMOLL J., SAUNDERS P.T.K., NIESCHLAG E. und PARVINEN M. (1992). FSH receptor mRNA is expressed stage-dependently during rat spermatogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 84 (3): R45–R49.

- KLONISCH T., KAUFFOLD J., STEGER K., BERGMANN M., LEISER R., FISCHER B. und HOMBACH-KLONISCH S. (2001). Canine relaxin-like factor: Unique molecular structure and differential expression within reproductive tissues of the dog. *Biol. Reprod.* 64 (2): 442–450.
- KLUGE M., SCHÜSSLER P., UHR M., YASSOURIDIS A. und STEIGER A. (2007). Ghrelin suppresses secretion of luteinizing hormone in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92 (8): 3202–3205.
- KLUGE M., UHR M., BLENINGER P., YASSOURIDIS A. und STEIGER A. (2009). Ghrelin suppresses secretion of FSH in males. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 70 (6): 920–923.
- KNOL B.W., DIELEMAN S.J., BEVERS M.M. und VAN DEN BROM W.E. (1993). GnRH in the male dog: Dose-response relationships with LH and testosterone. *J. Reprod. Fertil.* 98 (1): 159–161.
- KOCH A., HOPPEN H.O., DIELEMAN S.J., KOOISTRA H.S. und GÜNZEL-APEL A.R. (2006). Effects of the dopamine agonist cabergoline on the pulsatile and TRH-induced secretion of prolactin, LH, and testosterone in male beagle dogs. *Theriogenology* 65 (8): 1666–1677.
- KOHSAKA T., KATO S., QIN S., MINAGAWA I., YOGO K., KAWARASAKI T. und SADAD H. (2009). Identification of boar testis as a source and target tissue of relaxin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1160: 194–196.
- KOJIMA M., HOSODA H., DATE Y., NAKAZATO M., MATSUO H. und KANGAWA K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402 (6762): 656–660.
- KOOCHKPOUR S. (2010). Androgen receptor signaling and mutations in prostate cancer. *Asian J Androl.* 12 (5): 639–657.
- KOTHARI L.K., PATINI M.K. und JAIN M.L. (1978). The total Leydig cell volume of the testis in some common mammals. *Andrologia* 10 (3): 218–222.

- KOTHARI L.K., SRIVASTAVA D.K., MISHRA P. und PATNI M.K. (1972). Total Leydig cell volume and its estimation in dogs and in models of testis. *Anat. Rec.* 174 (2): 259–264.
- KRISHNAMURTHY H., WEINBAUER G.F., ASLAM H., YEUNG C.H. und NIESCHLAG E. (1998). Quantification of apoptotic testicular germ cells in normal and methoxyacetic acid-treated mice as determined by flow cytometry. *J. Androl.* 19 (6): 710–717.
- KUBISTA M., ANDRADE J., BENGTSSON M., FOROOTAN A., JONÁK J., LIND K., SINDELKA R., SJÖBACK R., SJÖGREEN B., STRÖMBOM L., STÅHLBERG A. und ZORIC N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med.* 27 (2-3): 95–125.
- KUIPER G.G.J.M., FABER P.W., VAN ROOIJ H.C.J., VAN DER KORPUT J.A.G.M., RIS-STALPERS C., KLAASSEN P., TRAPMAN J. und BRINKMANN A.O. (1989). Structural organization of the human androgen receptor gene. *J. Mol. Endocrinol.* 2 (3): R1–4.
- KUMAGAI J., HSU S.Y., MATSUMI H., ROH J.S., FU P., WADE J.D., BATHGATE R.A.D. und HSUEH A.J.W. (2002). INSL3/Leydig insulin-like peptide activates the LGR8 receptor important in testis descent. *J. Biol. Chem.* 277 (35): 31283–31286.
- KURIEN B.T., DORRI Y., DILLON S., DSOUZA A. und SCOFIELD R.H. (2011). An overview of Western blotting for determining antibody specificities for immunohistochemistry. *Methods Mol. Biol.* 717: 55–67.
- KURIEN B.T. und SCOFIELD R.H. (2006). Western blotting. *Methods* 38 (4): 283–293.
- KUROSUMI M., ISHIMURA K., FUJITA H. und OSAWA Y. (1985). Immunocytochemical localization of aromatase in rat testis. *Histochemistry* 83 (5): 401–404.
- LACOSTE D., DUBÉ D., TRUDEL C., BÉLANGER A. und LABRIE F. (1989). Normal gonadal functions and fertility after 23 months of treatment of prepubertal male and female dogs with the GnRH agonist [D-Trp6, des-Gly-NH2(10)]GnRH ethylamide. *J Androl.* 10 (6): 456–65.

- LAEMMLI U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259): 680–685.
- LANG G. (2006). Immunhistochemie. In: G. Lang (Herausgeber), *Histotechnik - Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik*, 257–295. Springer-Verlag, Wien, 1. Auflage.
- LAUNAY S., HERMINE O., FONTENAY M., KROEMER G., SOLARY E. und GARRIDO C. (2005). Vital functions for lethal caspases. *Oncogene* 24 (33): 5137–5148.
- LE GAC F. und DE KRETZER D.M. (1982). Inhibin production by Sertoli cell cultures. *Mol. Cell. Endocrinol.* 28 (3): 487–498.
- LEBLOND C.P. und CLERMONT Y. (1952). Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the „periodic acid-fuchsin sulfurous acid“ technique. *Am. J. Anat.* 90 (2): 167–215.
- LEBRETHON M.C., AGANINA A., FOURNIER M., GÉRARD A., PARENT A.S. und BOURGUIGNON J.P. (2007). Effects of in vivo and in vitro administration of ghrelin, leptin and neuropeptide mediators on pulsatile gonadotrophin-releasing hormone secretion from male rat hypothalamus before and after puberty. *J. Neuroendocrinol.* 19 (3): 181–188.
- LEE J., RICHBURG J.H., YOUNKIN S.C. und BOEKELHEIDE K. (1997). The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology* 138 (5): 2081–2088.
- LEVALLET J., BILINSKA B., MITTRE H., GENISSEL C., FRESNEL J. und CARREAU S. (1998). Expression and immunolocalization of functional cytochrome P450 aromatase in mature rat testicular cells. *Biol. Reprod.* 58 (4): 919–926.
- LIEBICH H.G. (1999a). Männliche Geschlechtsorgane (Organa genitalia masculina). In: H.G. Liebich (Herausgeber), *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere - Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis*, Kapitel 13, 262–283. F. K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 3. Auflage.

- LIEBICH H.G. (1999b). Zelle (Cellula). In: H.G. Liebich (Herausgeber), Funktionelle Histologie der Haussäugetiere - Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis, Kapitel 1, 2–34. F. K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 3. Auflage.
- LIEBICH H.G. (2000). Generations- oder Zellzyklus. In: W. Ahne, H.E. König, H.G. Liebich und M. Stohrer (Herausgeber), Zoologie - Lehrbuch für Studierende der Veterinärmedizin und Agrarwissenschaften, Kapitel 1.12, 20–24. F. K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1. Auflage.
- LIVESEY J.H., HODGKINSON S.C., ROUD H.R. und DONALD R.A. (1980). Effect of time, temperature and freezing on the stability of immunoreactive LH, FSH, TSH, growth hormone, prolactin and insulin in plasma. *Clin. Biochem.* 13 (4): 151–155.
- LLOYD J.W., THOMAS J.A. und MAWHINNEY M.G. (1975). Androgens and estrogens in the plasma and prostatic tissue of normal dogs and dogs with benign prostatic hypertrophy. *Invest Urol* 13 (3): 220–222.
- LOUIS B.G. und FRITZ I.B. (1979). Follicle-stimulating hormone and testosterone independently increase the production of androgen-binding protein by Sertoli cells in culture. *Endocrinology* 104 (2): 454–461.
- LOWSETH L.A., GERLACH R.F., GILLETT N.A. und MUGGENBURG B.A. (1990). Age-related changes in the prostate and testes of the beagle dog. *Vet. Pathol.* 27 (5): 347–353.
- LOY C.J., SIM K.S. und YONG E.L. (2003). Filamin-A fragment localizes to the nucleus to regulate androgen receptor and coactivator functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (8): 4562–4567.
- LU B., SMOCK S.L., CASTLEBERRY T.A. und OWEN T.A. (2001). Molecular cloning and functional characterization of the canine androgen receptor. *Mol. Cell. Biochem.* 226 (1-2): 129–140.
- LUBAHN D.B., JOSEPH D.R., SULLIVAN P.M., WILLARD H.F., FRENCH F.S. und WILSON E.M. (1988). Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science* 240 (4850): 327–330.

- LUDWIG C. (2008). Downregulation der hypophysären GnRH-Rezeptoren mit einem neuen GnRH-Implantat beim Rüden. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet. beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.
- LUDWIG C., DESMOULINS P.O., DRIANCOURT M.A., GOERICKE-PESCH S. und HOFFMANN B. (2009). Reversible downregulation of endocrine and germinative testicular function (hormonal castration) in the dog with the GnRH-agonist Azagly-Nafarelin as a removable implant „Gonazon“; a preclinical trial. *Theriogenology* 71 (7): 1037–1045.
- LYNG F.M., JONES G.R. und ROMMERTS F.F.G. (2000). Rapid androgen actions on calcium signaling in rat Sertoli cells and two human prostatic cell lines: Similar biphasic responses between 1 picomolar and 100 nanomolar concentrations. *Biol. Reprod.* 63 (3): 736–747.
- LÖFFLER G. (1998). Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene. In: G. Löffler und P.E. Petrides (Herausgeber), *Biochemie und Pathobiochemie*, Kapitel 16.1.6, 441–445. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 6., korrigierte Auflage.
- MADDOCKS S. und SHARPE R.M. (1989). Assessment of the contribution of Leydig cells to the secretion of inhibin by the rat testis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 67 (1): 113–118.
- MAEDA K., OHKURA S., UENOYAMA Y., WAKABAYASHI Y., OKA Y., TSUKAMURA H. und OKAMURA H. (2010). Neurobiological mechanisms underlying GnRH pulse generation by the hypothalamus. *Brain Res.* 1364: 103–115.
- MAEDA K., TSUKAMURA H., OHKURA S., KAWAKAMI S., NAGABUKURO H. und YOKOYAMA A. (1995). The LHRH pulse generator: A mediobasal hypothalamic location. *Neurosci Biobehav Rev* 19 (3): 427–437.
- MAEKAWA M., KAMIMURA K. und NAGANO T. (1996). Peritubular myoid cells in the testis: Their structure and function. *Arch. Histol. Cytol.* 59 (1): 1–13.
- MAGUIRE S.M., TRIBLEY W.A. und GRISWOLD M.D. (1997). Follicle-stimulating hormone (FSH) regulates the expression of FSH receptor messenger ribonucleic acid in

- cultured Sertoli cells and in hypophysectomized rat testis. *Biol. Reprod.* 56 (5): 1106–1111.
- MAJDIC G., MCNEILLY A.S., SHARPE R.M., EVANS L.R., GROOME N.P. und SAUNDERS P.T.K. (1997). Testicular expression of inhibin and activin subunits and follistatin in the rat and human fetus and neonate and during postnatal development in the rat. *Endocrinology* 138 (5): 2136–2147.
- MALONE J.Y. (1918). Spermatogenesis of the dog. *Trans Am Microsc Soc* 37 (2): 97–110.
- MANGELSDORF D.J., THUMMEL C., BEATO M., HERRLICH P., SCHÜTZ G., UMESONO K., BLUMBERG B., KASTNER P., MARK M., CHAMBON P. und EVANS R.M. (1995). The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell* 83 (6): 835–839.
- MARATHE G.K., SHETTY J. und DIGHE R.R. (1995). Selective immunoneutralization of luteinizing hormone results in the apoptotic cell death of pachytene spermatocytes and spermatids in the rat testis. *Endocrine* 3 (19): 705–709.
- MARINO G. und ZANGHI A. (2013). Activins and inhibins: Expression and role in normal and pathological canine reproductive organs: A review. *Anat. Histol. Embryol.* 42 (1): 1–8.
- MARIVOET S., VAN DIJCK P., VERHOEVEN G. und HEYNS W. (1992). Interaction of the 90-kDa heat shock protein with native and in vitro translated androgen receptor and receptor fragments. *Mol. Cell. Endocrinol.* 88 (1-3): 165–174.
- MARTINI A.C., FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ R., TOVAR S., NAVARRO V.M., VIGO E., VAZQUEZ M.J., DAVIES J.S., THOMPSON N.M., AGUILAR E., PINILLA L., WELLS T., DIEGUEZ C. und TENA-SEMPERE M. (2006). Comparative analysis of the effects of ghrelin and unacylated ghrelin on luteinizing hormone secretion in male rats. *Endocrinology* 147 (5): 2374–2382.
- MASHIMA T., NAITO M., NOGUCHI K., MILLER D.K., NICHOLSON D.W. und TSURUO T. (1997). Actin cleavage by CPP-32/apopain during the development of apoptosis. *Oncogene* 14 (9): 1007–1012.

- MATHER J.P., ATTIE K.M., WOODRUFF T.K., RICE G.C. und PHILLIPS D.M. (1990). Activin stimulates spermatogonial proliferation in germ-Sertoli cell cocultures from immature rat testis. *Endocrinology* 127 (6): 3206–3214.
- MCCABE M.J., TARULLI G.A., MEACHEM S.J., ROBERTSON D.M., SMOOKER P.M. und STANTON P.G. (2010). Gonadotropins regulate rat testicular tight junctions in vivo. *Endocrinology* 151 (6): 2911–2922.
- MCCULLAGH D.R. (1932). Dual endocrine activity of the testis. *Science* 76 (1957): 19–20.
- MCGADEY J. (1970). A tetrazolium method for non-specific alkaline phosphatase. *Histochemie* 23 (2): 180–184.
- MCLACHLAN R.I., MATSUMOTO A.M., BURGER H.G., DE KRETZER D.M. und BREMNER W.J. (1988a). Follicle-stimulating hormone is required for quantitatively normal inhibin secretion in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 67 (6): 1305–1308.
- MCLACHLAN R.I., MATSUMOTO A.M., BURGER H.G., DE KRETZER D.M. und BREMNER W.J. (1988b). Relative roles of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in the control of inhibin secretion in normal men. *J. Clin. Invest.* 82 (3): 880–884.
- MEACHEM S.J., MCLACHLAN R.I., STANTON P.G., ROBERTSON D.M. und WREFORD N.G. (1999). FSH immunoneutralization acutely impairs spermatogonial development in normal adult rats. *J. Androl.* 20 (6): 756–762.
- MEACHEM S.J., RUWANPURA S.M., ZIOLKOWSKI J., AGUE J.M., SKINNER M.K. und LOVELAND K.L. (2005). Developmentally distinct in vivo effects of FSH on proliferation and apoptosis during testis maturation. *J. Endocrinol.* 186 (3): 429–449.
- MEDEMA J.P., SCAFFIDI C., KISCHKEL F.C., SHEVCHENKO A., MANN M., KRAMMER P.H. und PETER M.E. (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J.* 16 (10): 2794–2804.

- MEUNIER H., RIVIER C., EVANS R.M. und VALE W. (1988). Gonadal and extragonadal expression of inhibin α , β A, and β B subunits in various tissues predicts diverse functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85 (1): 247–251.
- MICHAEL C.M. (1973). Prostaglandins in swine testes. *Lipids* 8 (2): 92–93.
- MIGEON B.R., BROWN T.R., AXELMAN J. und MIGEON C.J. (1981). Studies of the locus for androgen receptor: Localization on the human X chromosome and evidence for homology with the Tfm locus in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78 (10): 6339–6343.
- MINOUCHI O. (1928). The spermatogenesis of the dog, with special reference to meiosis. *Jap. Jour. Zool.* 1: 255–268.
- MISCHKE R., MEURER D., HOPPEN H.O., UEBERSCHÄR S. und HEWICKER-TRAUTWEIN M. (2002). Blood plasma concentrations of oestradiol-17 β , testosterone and testosterone/oestradiol ratio in dogs with neoplastic and degenerative testicular diseases. *Res. Vet. Sci.* 73 (3): 267–272.
- MORALES E., PASTOR L.M., FERRER C., ZUASTI A., PALLARÉS J., HORN R., CALVO A., SANTAMARÍA L. und CANTERAS M. (2002). Proliferation and apoptosis in the seminiferous epithelium of photoinhibited Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Int. J. Androl.* 25 (5): 281–287.
- MORRIS P.L., VALE W.W., CAPPEL S. und BARDIN C.W. (1988). Inhibin production by primary Sertoli cell-enriched cultures: Regulation by follicle-stimulating hormone, androgens, and epidermal growth factor. *Endocrinology* 122 (2): 717–725.
- MOSKOVITZ B., MUNICHOR M. und LEVIN D. (1987). Effect of diclofenac sodium (Voltaren) and prostaglandin E2 on spermatogenesis in mature dogs. *Eur. Urol.* 13 (6): 393–396.
- MULLIS K.B. und FALOONA F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 155: 335–350.

- MUTEMBEI H.M., PESCH S., SCHULER G. und HOFFMANN B. (2005). Expression of oestrogen receptors α and β and of aromatase in the testis of immature and mature boars. *Reprod. Domest. Anim.* 40 (3): 228–236.
- MUZIO M., CHINNAIYAN A.M., KISCHKE F.C., O'ROURKE K., SHEVCHENKO A., NI J., SCAFFIDI C., BRETZ J.D., ZHANG M., GENTZ R., MANN M., KRAMMER P.H., PETER M.E. und DIXIT V.M. (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85 (6): 817–827.
- NAIR R. und SHAHA C. (2003). Diethylstilbestrol induces rat spermatogenic cell apoptosis in vivo through increased expression of spermatogenic cell Fas/FasL system. *J. Biol. Chem.* 278 (8): 6470–6481.
- NEF S. und PARADA L.F. (1999). Cryptorchidism in mice mutant for *Insl3*. *Nat. Genet.* 22 (3): 295–299.
- NEMOTO T., OHARA-NEMOTO Y., SHIMAZAKI S. und OTA M. (1994). Dimerization characteristics of the DNA- and steroid-binding domains of the androgen receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 50 (5-6): 225–233.
- NICHOLLS P.K., STANTON P.G., CHEN J.L., OLCORN J.S., HAVERFIELD J.T., QIAN H., WALTON K.L., GREGOREVIC P. und HARRISON C.A. (2012). Activin signaling regulates Sertoli cell differentiation and function. *Endocrinology* 153 (12): 6065–6077.
- NICHOLSON H.D., SWANN R.W., BURFORD G.D., WATHES D.C., PORTER D.G. und PICKERING B.T. (1984). Identification of oxytocin and vasopressin in the testis and in adrenal tissue. *Regul. Pept.* 8 (2): 141–146.
- NIEDERBERGER C.S., SHUBHADA S., KIM S.J. und LAMB D.J. (1993). Paracrine factors and the regulation of spermatogenesis. *World J Urol.* 11 (2): 120–128.
- NITTA H., BUNICK D., HESS R.A., JANULIS L., NEWTON S.C., MILLETTE C.F., OSAWA Y., SHIZUTA Y., TODA K. und BAHR J.M. (1993). Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase. *Endocrinology* 132 (3): 1396–1401.

- NUÑEZ G., BENEDICT M.A., HU Y. und INOHARA N. (1998). Caspases: The proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 17 (25): 3237–3245.
- OAKBERG E.F. (1956). A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *Am. J. Anat.* 99 (3): 391.
- ORTEGA-PACHECO A., RODRÍGUEZ-BUENFIL J.C., SEGURA-CORREA J.C., BOLIO-GONZALEZ M.E., JIMÉNEZ-COELLO M. und FORSBERG C.L. (2006). Pathological conditions of the reproductive organs of male stray dogs in the tropics: Prevalence, risk factors, morphological findings and testosterone concentrations. *Reprod. Domest. Anim.* 41 (5): 429–437.
- O'SHAUGHNESSY P. (2014). Hormonal control of germ cell development and spermatogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 29: 55–65.
- PARDEE A.B. (1989). G₁ events and regulation of cell proliferation. *Science* 246 (4930): 603–608.
- PATT H.M. und QUASTLER H. (1963). Radiation effects on cell renewal and related systems. *Physiol. Rev.* 43 (3): 357–396.
- PAULL W.K., TURKELSON C.M., THOMAS C.R. und ARIMURA A. (1981). Immunohistochemical demonstration of a testicular substance related to luteinizing hormone-releasing hormone. *Science* 213 (4513): 1263–1264.
- PEARL C.A., MASON H. und ROSER J.F. (2011). Immunolocalization of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta and androgen receptor in the pre-, peri- and post-pubertal stallion testis. *Anim. Reprod. Sci.* 125 (1-4): 103–111.
- PENTIKÄINEN V., ERKKILÄ K. und DUNKEL L. (1999). Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis in vitro. *Am. J. Physiol.* 276 (2 Pt 1): E310–E316.
- PETERS M.A.J., DE JONG F.H., TEERDS K.J., DE ROOIJ D.G., DIELEMAN S.J. und VAN SLUIJS F.J. (2000). Ageing, testicular tumours and the pituitary-testis axis in dogs. *J. Endocrinol.* 166 (1): 153–161.

- PFAFFL M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29 (9): 2002–2007.
- PFAFFL M.W. (2004a). Quantification strategies in real-time PCR. In: S. Bustin (Herausgeber), A-Z of quantitative PCR, Kapitel 3. International University Line (IUL), La Jolla, CA, USA.
- PFAFFL M.W. (2004b). Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum* 1: 92–95.
- PFAFFL M.W. (2006). Neue Entwicklungen in der post-qPCR-Datenanalyse. *Laborwelt* 1: 10–13. Unter: <http://www.gene-quantification.de/pfaffl-bioinf-lw-2006.pdf> [Stand: 31.01.2013].
- PFAFFL M.W., HORGAN G.W. und DEMPFLER L. (2002). Relative expression software tool (REST[®]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30 (9): e36.
- PICKERING B.T., BIRKETT S.D., GULDENAAR S.E.F., NICHOLSON H.D., WORLEY R.T.S. und YAVACHEV L. (1989). Oxytocin in the testis: What, where, and why? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 564: 198–209.
- PIERIK F.H., VREEBURG J.T.M., STIJNEN T., DE JONG F.H. und WEBER R.F.A. (1998). Serum inhibin B as a marker of spermatogenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83 (9): 3110–3114.
- PRESCOTT D.M. (1968). Regulation of cell reproduction. *Cancer Res.* 28 (9): 1815–1820.
- RAHMANZADEH R., HÜTTMANN G., GERDES J. und SCHOLZEN T. (2007). Chromophore-assisted light inactivation of pKi-67 leads to inhibition of ribosomal RNA synthesis. *Cell Prolif.* 40 (3): 422–430.
- RAMESH R., PEARL C.A., AT-TARAS E., ROSER J.F. und BERGER T. (2007). Ontogeny of androgen and estrogen receptor expression in porcine testis: Effect of reducing testicular estrogen synthesis. *Anim. Reprod. Sci.* 102 (3-4): 286–299.

- RANNIKKO A., PENTTILÄ T.L., ZHANG F.P., TOPPARI J., PARVINEN M. und HUHTANIEMI I. (1996). Stage-specific expression of the FSH receptor gene in the prepubertal and adult rat seminiferous epithelium. *J. Endocrinol.* 151 (1): 29–35.
- REDDING T.W., SCHALLY A.V., ARIMURA A. und MATSUO H. (1972). Stimulation of release and synthesis of luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) in tissue cultures of rat pituitaries in response to natural and synthetic LH and FSH releasing hormone. *Endocrinology* 90 (3): 764–770.
- REDDY G.P., PRASAD M., SAILESH S., KUMAR Y.V.K. und REDDANNA P. (1992). The production of arachidonic acid metabolites in rat testis. *Prostaglandins* 44 (6): 497–507.
- RENATUS M., STENNICKE H.R., SCOTT F.L., LIDDINGTON R.C. und SALVESEN G.S. (2001). Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (25): 14250–14255.
- REUBOLD T.F., WOHLGEMUTH S. und ESCHENBURG S. (2009). A new model for the transition of APAF-1 from inactive monomer to caspase-activating apoptosome. *J. Biol. Chem.* 284 (47): 32717–32724.
- RICHARDS A.J., ENDERS G.C. und RESNICK J.L. (1999). Differentiation of murine premigratory primordial germ cells in culture. *Biol. Reprod.* 61 (4): 1146–1151.
- RIESENBECK A., DENGLE P. und HOFFMANN B. (1999). Zum Vorkommen physiologischer und pathophysiologischer Estrogenwerte beim Rüden. In: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft - Fachgruppe Kleintierkrankheiten, 45. Jahrestagung.
- RIESENBECK A., KLEIN R. und HOFFMANN B. (2002). Downregulation, eine neue, reversible Möglichkeit zur Ausschaltung der Hodenfunktion beim Rüden. *Der praktische Tierarzt* 83 (6): 512–520.
- RISBRIDGER G.P., CLEMENTS J., ROBERTSON D.M., DRUMMOND A.E., MUIR J., BURGER H.G. und DE KRETZER D.M. (1989). Immuno- and bioactive inhibin and inhibin α -subunit expression in rat Leydig cell cultures. *Mol. Cell. Endocrinol.* 66 (1): 119–122.

- RIVIER C., CORRIGAN A. und VALE W. (1991). Effect of recombinant human inhibin on gonadotropin secretion by the male rat. *Endocrinology* 129 (4): 2155–2159.
- ROBERTS V., MEUNIER H., SAWCHENKO P.E. und VALE W. (1989a). Differential production and regulation of inhibin subunits in rat testicular cell types. *Endocrinology* 125 (5): 2350–2359.
- ROBERTS V., MEUNIER H., VAUGHAN J., RIVIER J., RIVIER C., VALE W. und SAWCHENKA P. (1989b). Production and regulation of inhibin subunits in pituitary gonadotropes. *Endocrinology* 124 (1): 552–554.
- ROOSEN-RUNGE E. (1955). Untersuchungen über die Degeneration samenbildender Zellen in der normalen Spermatogenese der Ratte. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 41 (3-4): 221–235.
- ROY A.K. und CHATTERJEE B. (1995). Androgen action. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 5 (2): 157–176.
- RUIZEVELD DE WINTER J.A., TRAPMAN J., VERMEY M., MULDER E., ZEGERS N.D. und VAN DER KWAST T.H. (1991). Androgen receptor expression in human tissues: An immunohistochemical study. *J. Histochem. Cytochem.* 39 (7): 927–936.
- RUSSELL L.D. (1998). Sertoli cells, overview. In: E. Knobil und J.D. Neill (Herausgeber), *Encyclopedia of Reproduction*, Band 4, 381–387. Academic Press, San Diego, CA, 1. Auflage.
- RUSSELL L.D., ETTLIN R., HIKIM A.P.S. und CLEGG E.D. (1990a). The classification and timing of spermatogenesis. In: L.D. Russell, R. Ettlin, A.P.S. Hikim und E.D. Clegg (Herausgeber), *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*, Kapitel 2, 41–58. Cache River Press, Clearwater, FL, USA, 1. Auflage.
- RUSSELL L.D., ETTLIN R., HIKIM A.P.S. und CLEGG E.D. (1990b). Staging for laboratory species - Staging for the dog. In: L.D. Russell, R. Ettlin, A.P.S. Hikim und E.D. Clegg (Herausgeber), *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*, Kapitel 4, 162–194. Cache River Press, Clearwater, FL, USA, 1. Auflage.

- RUSSELL L.D., REN H.P., HIKIM I.S., SCHULZE W. und HIKIM A.P.S. (1990c). A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. *Am. J. Anat.* 188 (1): 21–30.
- RUWANPURA S.M., MCLACHLAN R.I., STANTON P.G. und MEACHEM S.J. (2008). Follicle-stimulating hormone affects spermatogonial survival by regulating the intrinsic apoptotic pathway in adult rats. *Biol. Reprod.* 78 (4): 705–713.
- RÖCKEN F.E., NOTHELFER H.B. und HOFFMANN B. (1995). Testosteronkonzentrationen im peripheren Plasma sowie morphologische Hodenbefunde von Rüden mit einer Perinealhernie. *Kleintierpraxis* 40 (4): 261–267.
- SAID T.M., PAASCH U., GLANDER H.J. und AGARWAL A. (2004). Role of caspases in male infertility. *Hum. Reprod. Update* 10 (1): 39–51.
- SAKAHIRA H., ENARI M. und NAGATA S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391 (6662): 96–99.
- SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY INC. (n. d.). AR (N-20): sc-816. Technischer Bericht, Santa Cruz Biotechnology, Inc.
- SANTOS M., MARCOS R. und CANIATTI M. (2010). Cytologic study of normal canine testis. *Theriogenology* 73 (2): 208–214.
- SANYAL A., O'DRISCOLL S.W., BOLANDER M.E. und SARKAR G. (1997). An effective method of completely removing contaminating genomic DNA from an RNA sample to be used for PCR. *Mol. Biotechnol.* 8 (2): 135–137.
- SAR M., LUBAHN D.B., FRENCH F.S. und WILSON E.M. (1990). Immunohistochemical localization of the androgen receptor in rat and human tissues. *Endocrinology* 127 (6): 3180–3186.
- SAYGIN M., CALISKAN S., KARAHAN N., KOYU A., GUMRAL N. und UGUZ A. (2011). Testicular apoptosis and histopathological changes induced by a 2.45 GHz electromagnetic field. *Toxicol Ind Health* 27 (5): 455–463.

- SCHALLY A.V., ARIMURA A., BABA Y., NAIR R.M.G., MATSUO H., REDDING T.W. und DEBELJUK L. (1971). Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43 (2): 393–399.
- SCHAUFELE F., CARBONELL X., GUERBADOT M., BORNGRAEBER S., CHAPMAN M.S., MA A.A.K., MINER J.N. und DIAMOND M.I. (2005). The structural basis of androgen receptor activation: Intramolecular and intermolecular amino-carboxy interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (28): 9802–9807.
- SCHILD T.A. (n. d.). ‘‘‘7700 SDS Workshop’’’ Einführung in die Real-Time TaqManTM PCR-Technologie, Vers. 2.1. Technischer Bericht, Applied Biosystems GmbH Weiterstadt, <https://www.core-facility.uni-freiburg.de/lc480/lc480obj/sdsman> (Stand 01.03.2015).
- SCHLÜTER C., DUCHROW M., WOHLLENBERG C., BECKER M.H.G., KEY G., FLAD H.D. und GERDES J. (1993). The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: A very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J. Cell Biol.* 123 (3): 513–522.
- SCHNEIDER M.R. (2012). Franz von Leydig (1821-1908), pioneer of comparative histology. *J Med Biogr* 20 (2): 79–83.
- SCHNEIDER O., NAU R. und MICHEL U. (2000). Comparative analysis of follistatin-, activin beta A- and activin beta B-mRNA steady-state levels in diverse porcine tissues by multiplex S1 nuclease analysis. *Eur. J. Endocrinol.* 142 (5): 537–544.
- SCHOLZEN T., DIMMLER C., WOHLLENBERG C., FLAD H.D. und GERDES J. (1997). Novel splice forms of the Ki-67 mRNA. *Eur J Cell Biol* 72 (Suppl. 44): 40. Abstract.
- SCHOLZEN T. und GERDES J. (2000). The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.* 182 (3): 311–322.
- SCHONK D.M., KUIJPERS H.J.H., VAN DRUNEN E., VAN DALEN C.H., GEURTS VAN KESSEL A.H.M., VERHEIJEN R. und RAMAEKERS F.C.S. (1989). Assignment of the gene(s) involved in the expression of the proliferation-related Ki-67 antigen to human chromosome 10. *Hum. Genet.* 83 (3): 297–299.

- SEGRETAİN D., GILLERON J., CARETTE D., DENIZOT J.P. und POINTIS G. (2010). Differential time course of FSH/FSH receptor complex endocytosis within Sertoli and germ cells during rat testis development. *Dev. Dyn.* 239 (4): 1113–1123.
- SHAHA C. (2007). Modulators of spermatogenic cell survival. *Soc Reprod Fertil Suppl* 63: 173–186.
- SHAN L.X., BARDIN C.W. und HARDY M.P. (1997). Immunohistochemical analysis of androgen effects on androgen receptor expression in developing Leydig and Sertoli cells. *Endocrinology* 138 (3): 1259–1266.
- SHARPE R.M. und FRASER H.M. (1980a). HCG stimulation of testicular LHRH-like activity. *Nature* 287 (5783): 642–643.
- SHARPE R.M. und FRASER H.M. (1980b). Leydig cell receptors for luteinizing hormone releasing hormone and its agonists and their modulation by administration or deprivation of the releasing hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95 (1): 256–262.
- SHARPE R.M., FRASER H.M., COOPER I. und ROMMERTS F.F.G. (1981). Sertoli-Leydig cell communication via an LHRH-like factor. *Nature* 290 (5809): 785–787.
- SHARPE R.M., MCKINNELL C., KIVLIN C. und FISHER J.S. (2003). Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 125 (6): 769–784.
- SHI Y. (2002). Apoptosome: The cellular engine for the activation of caspase-9. *Structure* 10 (3): 285–288.
- SHUPNIK M.A. und SCHREIHOFFER D.A. (1997). Molecular aspects of steroid hormone action in the male reproductive axis. *J. Androl.* 18 (4): 341–344.
- SIEGEL R.M., FREDERIKSEN J.K., ZACHARIAS D.A., CHAN F.K.M., JOHNSON M., LYNCH D., TSIEN R.Y. und LENARDO M.J. (2000). Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* 288 (5475): 2354–2357.

- SIMPSON E.R., CLYNE C., RUBIN G., BOON W.C., ROBERTSON K., BRITT K., SPEED C. und JONES M. (2002). Aromatase - a brief overview. *Annu. Rev. Physiol.* 64: 93–127.
- SINOWATZ F. (2001). Morphologie und Histologie der männlichen Genitalorgane. In: W. Busch und A. Holzmann (Herausgeber), Veterinärmedizinische Andrologie - Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren, Kapitel 1, 1–22. Schattauer GmbH, Stuttgart, 1. Auflage.
- SLEE E.A., ADRAIN C. und MARTIN S.J. (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276 (10): 7320–7326.
- SOARES J.M., AVELAR G.F. und FRANÇA L.R. (2009). The seminiferous epithelium cycle and its duration in different breeds of dog (*Canis familiaris*). *J. Anat.* 215 (4): 462–471.
- SONNACK M. (2009). Untersuchungen zur Bildung, Regression und Funktionalität des Corpus luteum der nicht graviden Hündin, morphologische und biochemische Aspekte. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich Veterinärmedizin Justus-Liebig-Universität Giessen.
- STEINETZ B.G., BILLESBACH E.E., GOLDSMITH L.T., SCHWABE C. und LUST G. (1996). Use of synthetic canine relaxin to develop a rapid homologous radioimmunoassay. *Biol. Reprod.* 54 (5): 1252–1260.
- STEINETZ B.G., GOLDSMITH L.T. und LUST G. (1987). Plasma relaxin levels in pregnant and lactating dogs. *Biol. Reprod.* 37 (3): 719–725.
- STOCCO D.M. (1998). Testosterone biosynthesis. In: E. Knobil und J.D. Neill (Herausgeber), Encyclopedia of Reproduction, Band 4, 784–789. Academic Press, San Diego, CA, 1. Auflage.
- SUNDBY A. und ULSTEIN T. (1981). Plasma concentrations of testosterone in the male dog and plasma testosterone profile following single intramuscular injection of HCG. *Acta vet. scand.* 22 (3-4): 409–416.

- SUZUKI-YAMAMOTO T., SUGIMOTO Y., ICHIKAWA A. und ISHIMURA K. (2007). Co-localization of prostaglandin F synthase, cyclooxygenase-1 and prostaglandin F receptor in mouse Leydig cells. *Histochem. Cell Biol.* 128 (4): 317–322.
- SWIERSTRA E.E. und FOOTE R.H. (1963). Cytology and kinetics of spermatogenesis in the rabbit. *J. Reprod. Fertil.* 5 (3): 309–322.
- TAHA M.B. und NOAKES D.E. (1982). The effect of age and season of the year on testicular function in the dog, as determined by histological examination of the seminiferous tubules and the estimation of peripheral plasma testosterone concentrations. *J Small Anim Pract* 23 (6): 351–357.
- TAHA M.B., NOAKES D.E. und ALLEN W.E. (1981). The effect of season of the year on the characteristics and composition of dog semen. *J Small Anim Pract* 22 (4): 177–184.
- TANIYAMA H., HIRAYAMA K., NAKADA K., NUMAGAMI K., YAOSAKA N., KAGAWA Y., IZUMISAWA Y., NAKADE T., TANAKA Y., WATANABE G. und TAYA K. (2001). Immunohistochemical detection of inhibin- α , - β B, and - β A chains and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in canine testicular tumors and normal testes. *Vet. Pathol.* 38 (6): 661–666.
- TAPANAINEN J.S., TILLY J.L., VIHKO K.K. und HSUEH A.J.W. (1993). Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: Gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol. Endocrinol.* 7 (5): 643–650.
- TENA-SEMPERE M., BARREIRO M.L., GONZÁLEZ L.C., GAYTÁN F., ZHANG F.P., CAMINOS J.E., PINILLA L., CASANUEVA F.F., DIÉGUEZ C. und AGUILAR E. (2002). Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology* 143 (2): 717–725.
- THUN R., EGGENBERGER E. und ZEROBIN K. (1990). 24-hour profiles of plasma cortisol and testosterone in the male dog: Absence of circadian rhythmicity, seasonal influence and hormonal interrelationships. *Reprod. Domest. Anim.* 25: 68–77.

- TOMASETTO C., WENDLING C., RIO M.C. und POITRAS P. (2001). Identification of cDNA encoding motilin related peptide/ghrelin precursor from dog fundus. *Peptides* 22 (12): 2055–2059.
- TRAAS A.M. und KUSTRITZ M.V.R. (2004). Effect of administrating oxytocin or prostaglandin $F_{2\alpha}$ on characteristics of the canine ejaculate. *Can. Vet. J.* 45 (12): 999–1002.
- TRAUT W., ENDL E., SCHOLZEN T., GERDES J. und WINKING H. (2002). The temporal and spatial distribution of the proliferation associated Ki-67 protein during female and male meiosis. *Chromosoma* 111 (3): 156–164.
- TREMBLAY R.R., FOREST M.G., SHALF J., MARTEL J.G., KOWARSKI A. und MIGEON C.J. (1972). Studies on the dynamics of plasma androgens and on the origin of dihydrotestosterone in dogs. *Endocrinology* 91 (2): 556.
- TREMBLAY Y. und BELANGER A. (1985). Changes in plasma steroid levels after single administration of hCG or LHRH agonist analogue in dog and rat. *J. Steroid Biochem.* 22 (3): 315–320.
- TREMBLAY Y. und BÉLANGER A. (1984). Reversible inhibition of gonadal functions by a potent gonadotropin-releasing hormone agonist in adult dog. *Contraception* 30 (5): 483–497.
- TREMBLAY Y., BÉLANGER A., LABRIE F., FRENETTE G., DUBÉ J.Y. und TREMBLAY R.R. (1984). Characteristics of the inhibitory effect of chronic treatment with an LHRH agonist on testicular steroidogenesis in the dog. *Prostate* 5 (6): 631–638.
- TRIGG T.E., WRIGHT P.J., ARMOUR A.F., WILLIAMSON P.E., JUNAIDI A., MARTIN G.B., DOYLE A.G. und WALSH J. (2001). Use of a GnRH analogue implant to produce reversible long-term suppression of reproductive function in male and female domestic dogs. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 57: 255–261.
- TRIPICIANO A., FILIPPINI A., BALLARINI F. und PALOMBI F. (1998). Contractile response of peritubular myoid cells to prostaglandin $F_{2\alpha}$. *Mol. Cell. Endocrinol.* 138 (1-2): 143–150.

- TROIANO L., FUSTINI M.F., LOVATO E., FRASOLDATI A., MALORNI W., CAPRI M., GRASSILLI E., MARRAMA P. und FRANCESCHI C. (1994). Apoptosis and spermatogenesis: Evidence from an in vivo model of testosterone withdrawal in the adult rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202 (3): 1315–1321.
- TSAI M.Y., YEH S.D., WANG R.S., YEH S., ZHANG C., LIN H.Y., TZENG C.R. und CHANG C. (2006). Differential effects of spermatogenesis and fertility in mice lacking androgen receptor in individual testis cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (50): 18975–18980.
- TSO E.C.F. und LACY D. (1975). Effects of prostaglandin $F_{2\alpha}$ on the reproductive system on the male rat. *J. Reprod. Fertil.* 44 (3): 545–550.
- TSUBOTA T., NITTA H., OSAWA Y., MASON J.I., KITA I., TIBA T. und BAHR J.M. (1993). Immunolocalization of steroidogenic enzymes, P450scc, 3β -HSD, P450c17, and P450arom in the Hokkaido brown bear (*Ursus arctos yesoensis*) testis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 92 (3): 439–444.
- TYAGI R.K., LAVROVSKY Y., AHN S.C., SONG C.S., CHATTERJEE B. und ROY A.K. (2000). Dynamics of intracellular movement and nucleocytoplasmic recycling of the ligand-activated androgen receptor in living cells. *Mol. Endocrinol.* 14 (8): 1162–1174.
- UCCELLA S., LA ROSA S., GENASETTI A. und CAPELLA C. (2000). Localization of inhibin/activin subunits in normal pituitary and in pituitary adenoma. *Pituitary* 3 (3): 131–139.
- URHAUSEN C., SEEFELDT A., ESCHRICHT F.M., KOCH A., HOPPEN H.O., BEYERBACH M., MÖHRKE C., DIELEMAN S.J. und GÜNZEL-APEL A.R. (2009). Concentrations of prolactin, LH, testosterone, TSH and thyroxine in normospermic dogs of different breeds. *Reprod. Domest. Anim.* 44 (Suppl. 2): 279–282.
- VAN DORP D.A., BEERTHUIS R.K., NUGTEREN D.H. und VONKEMAN H. (1964). The biosynthesis of prostaglandins. *Biochim. Biophys. Acta* 90 (1): 204–207.

- VAN LAAR J.H., BOLT-DE VRIES J., VOORHORST-OGINK M.M. und BRINKMANN A.O. (1989). The human androgen receptor is a 110 kDa protein. *Mol. Cell. Endocrinol.* 63 (1-2): 39–44.
- VAN ROYEN M.E., VAN CAPPELLEN W.A., DE VOS C., HOUTSMULLER A.B. und TRAPMAN J. (2012). Stepwise androgen receptor dimerization. *J. Cell. Sci.* 125 (Pt 8): 1970–1979.
- VELDSCHOLTE J., BERREVOETS C.A., ZEGERS N.D., VAN DER KWAST T.H., GROO-TEGOED J.A. und MULDER E. (1992). Hormone-induced dissociation of the androgen receptor-heat-shock protein complex: Use of a new monoclonal antibody to distinguish transformed from nontransformed receptors. *Biochemistry* 31 (32): 7422–7430.
- VICKERY B.H., MCRAE G.I., BRIONES W., WORDEN A., SEIDENBERG R., SCHANBACHER B.D. und FALVO R. (1984). Effects of an LHRH agonist analog upon sexual function in male dogs - Suppression, reversibility, and effect of testosterone replacement. *J. Androl.* 5 (1): 28–42.
- VON BOMHARD D., PUKKAVESA C. und HAENICHEN T. (1978). The ultrastructure of testicular tumours in the dog: II. Leydig cells and Leydig cell tumors. *J. Comp. Pathol.* 88 (1): 59–65.
- VON ECKARDSTEIN S., SIMONI M., BERGMANN M., WEINBAUER G.F., GASSNER P., SCHEPERS A.G. und NIESCHLAG E. (1999). Serum inhibin B in combination with serum follicle-stimulating hormone (FSH) is a more sensitive marker than serum FSH alone for impaired spermatogenesis in men, but cannot predict the presence of sperm in testicular tissue samples. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84 (7): 2496–2501.
- VON EULER U.S. (1935). Über die spezifische blutdrucksenkende Substanz des menschlichen Prostata- und Samenblasensekretes. *J. Mol. Med.* 14 (33): 1182–1183.
- VON LEDEBUR E.I.C.F., ALMEIDA J.P., LOSS E.S. und WASSERMANN G.F. (2002). Rapid effect of testosterone on rat Sertoli cell membrane potential. Relationship with K^+_{ATP} channels. *Horm. Metab. Res.* 34 (10): 550–555.

- VORNBERGER W., PRINS G., MUSTO N.A. und SUAREZ-QUIAN C.A. (1994). Androgen receptor distribution in rat testis: New implications for androgen regulation of spermatogenesis. *Endocrinology* 134 (5): 2307–2316.
- WACHTLER F., SCHWARZACHER H.G. und SCHNEDL W. (2005). Mikroskopische Präparate. In: F. Wachtler (Herausgeber), Histologie: Lehrbuch der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen, Kapitel 1.2, 26–40. Facultas, 7., verb. Auflage.
- WALKER W.H. (2010). Non-classical actions of testosterone and spermatogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 365 (1546): 1557–1569.
- WANG J., CHUN H.J., WONG W., SPENCER D.M. und LENARDO M.J. (2001). Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (24): 13884–13888.
- WASSERMANN G.F. und EIK-NES K.B. (1969). Interrelation between adrenal function and formation of testosterone in vivo in the testis of the dog. *Acta Endocrinol.* 61 (1): 33–47.
- WEISS J., CROWLEY JR. W.F., HALVORSON L.M. und JAMESON J.L. (1993). Perifusion of rat pituitary cells with gonadotropin-releasing hormone, activin, and inhibin reveals distinct effects on gonadotropin gene expression and secretion. *Endocrinology* 132 (6): 2307–2311.
- WEISSBACH L. und IBACH B. (1976). Quantitative parameters for light microscopic assessment of the tubuli seminiferi. *Fertil. Steril.* 27 (7): 836–847.
- WEITZE K.F. (2001a). Andrologie bei Rüde und Kater. In: W. Busch und A. Holzmänn (Herausgeber), Veterinärmedizinische Andrologie - Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren, Kapitel 11, 403–436. Schattauer GmbH, Stuttgart, 1. Auflage.
- WEITZE K.F. (2001b). Spermatologische Untersuchung. In: W. Busch und A. Holzmänn (Herausgeber), Veterinärmedizinische Andrologie - Physiologie und Pathologie

- der Fortpflanzung bei männlichen Tieren, Kapitel 6, 87–118. Schattauer GmbH, Stuttgart, 1. Auflage.
- WESSEL G.M. (2011). Accessorizing the testis. Enrico Sertoli and the „mother cell“ of the testis. *Mol. Reprod. Dev.* 78 (3): Fmi.
- WHITTINGTON K., ASSINDER S., GOULD M. und NICHOLSON H. (2004). Oxytocin, oxytocin-associated neurophysin and the oxytocin receptor in the human prostate. *Cell Tissue Res.* 318 (2): 375–382.
- WHITTINGTON K., ASSINDER S.J., PARKINSON T., LAPWOOD K.R. und NICHOLSON H.D. (2001). Function and localization of oxytocin receptors in the reproductive tissue of rams. *Reproduction* 122 (2): 317–325.
- WICKINGS E.J. und NIESCHLAG E. (1976). Stability of testosterone and androstenedione in blood and plasma samples. *Clinica Chimica Acta* 71 (3): 439–443.
- WILSON C.M. und MCPHAUL M.J. (1996). A and B forms of the androgen receptor are expressed in a variety of human tissues. *Mol. Cell. Endocrinol.* 120 (1): 51–57.
- WINTER M., PIRMAN J., FALVO R.E., SCHANBACHER B.D. und MILLER J. (1982). Steroidal control of gonadotrophin secretion in the orchidectomized dog. *J. Reprod. Fertil.* 64 (2): 449–455.
- WOODALL P.F. und JOHNSTONE I.P. (1988). Dimensions and allometry of testes, epididymides and spermatozoa in the domestic dog (*Canis familiaris*). *J. Reprod. Fertil.* 82 (2): 603–609.
- WOODRUFF T.K., BESECKE L.M., GROOME N., DRAPER L.B., SCHWARTZ N.B. und WEISS J. (1996). Inhibin A and inhibin B are inversely correlated to follicle-stimulating hormone, yet are discordant during the follicular phase of the rat estrous cycle, and inhibin A is expressed in a sexually dimorphic manner. *Endocrinology* 137 (12): 5463–5467.
- WROBEL K.H., BICKEL D. und KUJAT R. (1996). Immunohistochemical study of seminiferous epithelium in adult bovine testis using monoclonal antibodies against Ki-67

- protein and proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *Cell Tissue Res.* 283 (2): 191–201.
- XU Q., LIN H.Y., YEH S.D., YU I.C., WANG R.S., CHEN Y.T., ZHANG C., ALTUWAIJRI S., CHEN L.M., CHUANG K.H., CHIANG H.S., YEH S. und CHANG C. (2007). Infertility with defective spermatogenesis and steroidogenesis in male mice lacking androgen receptor in Leydig cells. *Endocrine* 32 (1): 96–106.
- YEUNG W.S.B., GULDENAAR S.E.F., WORLEY R.T.S., HUMPHRYS J. und PICKERING B.T. (1988). Oxytocin in Leydig cells: An immunocytochemical study of Percoll-purified cells from rat testes. *Cell Tissue Res.* 253 (2): 463–468.
- YKI-JÄRVINEN H., WAHLSTRÖM T. und SEPPÄLÄ M. (1983). Immunohistochemical demonstration of relaxin in the genital tract of men. *J. Reprod. Fertil.* 69 (2): 693–695.
- ZHANG H., SHENG X., HU X., LI X., XU H., ZHANG M., LI B., XU M., WENG Q., ZHANG Z. und TAYA K. (2010). Seasonal changes in spermatogenesis and immunolocalization of cytochrome P450 17 α -hydroxylase/c17-20 lyase and cytochrome P450 aromatase in the wild male ground squirrel (*Citellus dauricus* Brandt). *J. Reprod. Dev.* 56 (3): 297–302.
- ZHOU Q., NIE R., PRINS G.S., SAUNDERS P.T.K., KATZENELLENBOGEN B.S. und HESS R.A. (2002). Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. *J. Androl.* 23 (6): 870–881.
- ZHOU X., KUDO A., KAWAKAMI H. und HIRANO H. (1996). Immunohistochemical localization of androgen receptor in mouse testicular germ cells during fetal and postnatal development. *Anat. Rec.* 245 (3): 509–518.
- ZHU L.J., HARDY M.P., INIGO I.V., HUHTANIEMI I., BARDIN C.W. und MOO-YOUNG A.J. (2000). Effects of androgen on androgen receptor expression in rat testicular and epididymal cells: A quantitative immunohistochemical study. *Biol. Reprod.* 63 (2): 368–376.

- ZIMMERMANN S., STEDING G., EMMEN J.M.A., BRINKMANN A.O., NAYERIA K., HOLSTEIN A.F., ENGEL W. und ADHAM I.M. (1999). Targeted disruption of the *Insl3* gene causes bilateral cryptorchidism. *Mol. Endocrinol.* 13 (5): 681–691.
- ZIRKIN B.R. (1998). Spermatogenesis: its regulation by testosterone and FSH. *Semin. Cell Dev. Biol.* 9 (4): 417–421.
- ZIRKIN B.R., EWING L.L., KROMANN N. und COCHRAN R.C. (1980). Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog, and hamster testes perfused in vitro: Correlation with Leydig cell ultrastructure. *Endocrinology* 107 (6): 1867–1874.
- ZOLMAN J.C. und VALENTA L.J. (1980). Gonadotropin-releasing hormone receptor binding in bovine anterior pituitary. *Biochim. Biophys. Acta* 627 (2): 172–189.
- ZOU H., HENZEL W.J., LIU X., LUTSCHG A. und WANG X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90 (3): 405–413.
- ZOU H., LI Y., LIU X. und WANG X. (1999). An APAF-1·cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* 274 (17): 11549–11556.

Danksagung

Meinen besonderen Dank möchte ich meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Dr. h. c. Bernd Hoffmann für die Überlassung dieses interessanten und praxisrelevanten Themas sowie für seine hervorragende und überaus freundliche Betreuung während meiner gesamten Zeit als Doktorandin aussprechen. Vielen Dank, lieber Herr Professor Hoffmann, und die besten Wünsche für einen schönen Ruhestand!

Ein Dankeschön gilt auch Frau Professor Dr. Goericke-Pesch für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, für Ihren herzlichen Umgang mit den Beagle-Rüden und nicht zuletzt für viele schöne und wichtige Erfahrungen.

Bedanken möchte ich mich zudem bei der Firma Intervet Pharma R & D, Angers Technopole, Frankreich für die freundliche Zurverfügungstellung der „Gonazon®“-Implantate.

Ein weiterer Dank gilt Frau Dr. Gabi Itter von der Firma Sanofi-Aventis, Frankfurt für die freundliche Bereitstellung der Beaglerüden.

Dank auch an alle Beagle und deren Besitzer, welche mit Ihrem ausserordentlichen Engagement nicht nur die vorliegende Studie unterstützt, sondern auch ein erfolgreiches Vorbild für ein alternatives, tierfreundliches Versuchsmodell geliefert haben. Vielen Dank, dass Sie den Hunden ein dauerhaftes und liebevolles Zuhause gegeben haben!

Lieben Dank möchte ich auch Frau Dr. Gözde Özalp von der Klinik für Geburtshilfe und Gynäkologie der Veterinärmedizinischen Universität, Uludag Universität Bursa, Türkei für die freundliche Zusammenarbeit sowie die Gewinnung und Überlassung der juvenilen

Hoden sagen.

Herzlichen Dank sage ich auch Herrn Willi Damm und Frau Sabine Feller vom Endokrinologischen Labor der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität, Giessen für die Durchführung aller Hormonanalysen sowie ihre stete Freundlichkeit und unermüdliche Hilfsbereitschaft.

Vielmals danken möchte ich zudem Herrn Professor Dr. Martin Bergmann und Herrn Professor Dr. Ralph Brehm vom Institut für Veterinäranatomie, -Histologie und -Embryologie der Justus-Liebig-Universität, Giessen für ihre konstruktiven fachlichen Anregungen.

Auch danke ich sehr Herrn Professor Dr. Manfred Reinacher und Herrn Dr. Kernt Köhler vom Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität, Giessen für ihre fachliche Unterstützung.

Ein weiterer herzlicher Dank geht an Herrn Dr. Klaus Failing und Frau Marion Sparenberg von der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität, Giessen für die freundliche und angenehme Zusammenarbeit sowie die schnelle statistische Auswertung der umfangreichen Daten.

Vielen Dank möchte ich Herrn apl. Professor Dr. Gerhard Schuler sowie allen Kollegen und Mitdoktoranden für den Zusammenhalt und das freundliche, kollegiale Arbeitsklima sagen. Vielmals danke ich hierbei Herrn Dr. Henry M'Ikiugu Mutembei für die Einarbeitung in die Histologie der Spermatogenese. Desweiteren möchte ich mich insbesondere bei Frau Dr. Maike Naumann, Frau Dr. Sima Shenavai und Frau Dr. Michaela Gentil nicht nur für die fachlichen Diskussionen, sondern vor allem auch für ihre Freundschaft und all die vielen schönen und fröhlichen gemeinsamen Momente und Erlebnisse herzlich bedanken.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Frau Andrea Raffauf von der Tierarztpraxis

Raffauf, Mülheim-Kärlich und bei ihrem Team (Nicole, Lena, Hannah, Viola) für die Motivierung zum Schreiben und die gute Zusammenarbeit.

Ein besonders herzliches Dankeschön spreche ich meiner lieben Freundin Frau Dr. Bettina Tusche von der Tierärztlichen Praxisgemeinschaft Dr. Tusche und Dr. Müller, Nastätten sowie ihrem Team (Birgit und Beate) und Herrn Dr. Thomas Müller für ihre Freundschaft, den schönen beruflichen Einstieg in die tierärztliche Praxis und natürlich die stete Ermunterung zum Schreiben dieser Dissertation aus.

Ein großes Dankeschön sage ich meiner lieben Schwester Dr. Ulrike Weinhold für die motivierenden Gespräche und ihren emotionalen Beistand in allen Lagen. Liebe Uli, danke, dass du immer für mich da bist!

Meinen unendlichen Dank spreche ich meinen lieben Eltern Ulla und Peter Spang, die mich von klein an und jederzeit in meinem Tun und Werden mit all ihrer Liebe begleiten und unterstützen, aus. Liebe Mama, lieber Papa, diese Arbeit ist euch in großer Liebe und Dankbarkeit gewidmet!

Danken aus tiefstem Herzen möchte ich meinem besten Freund und Lebenspartner Benjamin Bernschütz, der mir während der gesamten Zeit der Dissertationsanfertigung beigestanden, mich motiviert und liebevoll begleitet hat. Lieber Benny, dir ein herzliches Dankeschön und viel Glück und Erfolg für den Abschluss deiner eigenen Dissertation!

Last but not least möchte ich mich an dieser Stelle recht herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben und möglicherweise nicht namentlich benannt sind.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6405-1



9 78 3 835 19 6405 1